

Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung  
Nr. 64

# **Untersuchung von Tetracyclin- und Sulfonamid-Resistenzen bei Mikroorganismen mit Kulturverfahren und molekularbiologischen Methoden**

Michael Mista

Veröffentlichungen  
des Instituts für Wasserforschung GmbH Dortmund

in Kooperation mit der

Dortmunder Energie- und Wasserversorgung GmbH  
Westfälischen Wasser- und Umweltanalytik GmbH  
und der  
Wasserwerke Westfalen GmbH

Dortmund 2006



**Untersuchung von Tetracyclin- und Sulfonamid-  
Resistenzen bei Mikroorganismen mit Kulturverfahren und  
molekularbiologischen Methoden**

***Diplomarbeit***

zur Erlangung des Diplom-Chemiker (FH)

vorgelegt von

Michael Mista  
geboren am 23.7.1980  
Mat.-Nr.: 200124302

durchgeführt am Institut für Wasserforschung GmbH, Dortmund

Betreuer am Institut: Frau Dr. Kuhlmann

FH Gelsenkirchen/Abt. Recklinghausen

FB 12 Angewandte Naturwissenschaften

SS 2006

Beginn: 17.3.2006

Abgabe: 17.7.2006

1. Betreuer: Herr Prof. Strotmann

2. Betreuer: Frau Prof. Loidl-Stahlhofen

Abgabe: .....

Datum

.....

Unterschrift



# Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und mich fremder Hilfe nicht bedient habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß veröffentlichtem oder unveröffentlichtem Schrifttum entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

.....

Datum

.....

Unterschrift

# Danksagung

Für die Betreuung meiner Diplomarbeit am Institut für Wasserforschung möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Birgit Kuhlmann und Frau Dr. Gudrun Preuß bedanken, die mir darüber hinaus jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch bedanken möchte ich mich bei der Geschäftsführerin Frau Ninette Zullei-Seibert und dem Institutsleiter Herr Frank Remmler, die mir die Durchführung der Diplomarbeit am IfW ermöglicht haben.

Für die Betreuung an der Fachhochschule Recklinghausen danke ich Herr Prof. Strotmann und Frau Prof. Loidl-Stahlhofen.

Für die Einarbeitung im mikrobiologischen Labor und die große Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten danke ich ganz besonders Herr Erik Ziemann.

Ich danke auch allen weiteren Mitarbeitern von IfW und WWU, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Für die Zusendung von Proben danke ich Herr Prof. Manfred Grote und seinen Mitarbeitern von der Universität Paderborn.

# Zusammenfassung

Antibiotika werden in der Human- und Veterinärmedizin in großen Mengen eingesetzt. Die Wirkstoffe induzieren im Organismus Resistenzen, die zusammen mit den Antibiotika von Mensch und Tier wieder ausgeschieden werden. Mit den Ausscheidungen gelangen die Antibiotika und die Resistenzen über verschiedene Eintragspfade in die Umwelt. Die Resistenzen sind in der Umwelt relativ persistent. Dies wird durch die vorhandenen Antibiotika unterstützt und kann auch zur Weitergabe der Resistenz an andere Bakterien führen. Zu den in der Umwelt vorhandenen Resistenzen und zu Methoden zur Bestimmung dieser gibt es einen erheblichen Forschungsbedarf. Daher wurden in dieser Diplomarbeit am Institut für Wasserforschung GmbH Methoden zur Bestimmung von resistenten Bakterien und den vorhandenen Resistenzgenen entwickelt. Die Methoden wurden in bezug auf die ausgewählten Antibiotika Chlortetracyclin (CTC) und Sulfadiazin (SFD) auf verschiedene Proben Feld- und Laboruntersuchungen angewendet. Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Bestimmung der KBE-Zahl zur Abschätzung der Lebendbakterienzahl und des Anteils resistenter Bakterien (Vergleich von koloniebildenden Einheiten auf Nährmedien mit und ohne Antibiotika)
- Bestimmung der Esterase-Aktivität zur Bestimmung der Bioaktivität der vorhandenen Bakterien und Abschätzung von Hemmeffekten der Antibiotika
- Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mit der Agar-Dilutionsmethode nach DIN 58940-6 zur Charakterisierung isolierter Bakterien
- PCR zur Bestimmung der Resistenzgene in Umweltproben und Bakterienisolaten

Die KBE-Zahl zeigte die Biomasse und die Esterase-Aktivität zeigte die Bioaktivität der in der Probe vorhanden Bakterien. Der Vergleich der KBE-Zahlen von antibiotikahaltigen und antibiotikafreien Nährmedien konnte zur Bestimmung von CTC-resistenten Bakterien eingesetzt werden. Zur Bestimmung von SFD-resistenten Bakterien eignete sich diese Methode nicht, da das SFD im Nähragar nicht antibiotisch wirksam ist. Gleiches galt für die nach DIN-Norm durchgeführte Methode der MHK-Bestimmung. Durch vorangestellte Kultivierung auf selektiven Nährböden, konnte mit diesen beiden Methoden auch die Bakterienklasse der resistenten Bakterien bestimmt werden. Das Problem der beiden Verfahren lag darin, dass nur kultivierbare Bakterien (in dieser Arbeit auf DEV-Nähragar kultivierbare) bestimmt werden konnten. Mit der PCR wurden alle Bakterien, die in einer Probe enthalten sind analysiert. Aber die PCR-Methode ist zur Bestimmung der Summe der

resistenten Bakterien nicht geeignet, da nur spezifische Resistenzgene erfasst werden können, von denen es im Falle des Tetracyclin 36 verschiedene gibt. Die 3 Resistenzgene gegen Sulfonamide konnten mit der PCR bestimmt werden. Die Gülle- und Bodenproben konnten in dieser Arbeit nur durch vorangestellte Kultivierung auf DEV-Nähragar in der PCR analysiert werden, da in diesen Proben in hoher Konzentration vorkommende Huminstoffe die PCR-Amplifikation hemmten.

Die beiden Kultivierungsverfahren konnten für SFD nicht angewendet werden und in der PCR gab es kein positives Ergebnis. Dies könnte an der Probenaufarbeitung gelegen haben.

Mit den Methoden der modifizierten KBE-Zahlen, der MHK-Bestimmung und der PCR konnten jedoch CTC-resistente Bakterien nachgewiesen werden. So wurden mit allen drei Methoden CTC-resistente Bakterien in Gülleproben detektiert. Mit der MHK-Bestimmung konnten auch in Boden- und sogar in einer Oberflächenwasserprobe CTC-resistente Bakterien nachgewiesen werden. Die CTC-resistenten Bakterien wurden durch Gülleausbringung in den Boden eingetragen und sind wahrscheinlich durch Oberflächenabfluss in das Oberflächenwasser gelangt.

Nach weiterer Optimierung der Probenaufarbeitung ist die PCR zur Bestimmung von Resistenzgenen einsetzbar. Da keine summarische Analyse der resistenten Bakterien möglich ist, sollte die MHK-Bestimmung zur Bestätigung oder als Voruntersuchung, ob resistente Bakterien überhaupt vorhanden sind, mitgeführt werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung.....	1
1.2 Veranlassung.....	2
1.3 Ziel der Arbeit.....	2
<b>2 Stand des Wissens</b> .....	<b>3</b>
2.1 Antibiotika.....	3
2.2 Eintrag von Antibiotika in die Umwelt.....	4
2.3 Antibiotikaresistenzen.....	6
2.4 Tetracycline.....	7
2.4.1 Chemische Eigenschaften.....	9
2.4.2 Wirkmechanismus.....	11
2.4.3 Tetracyclinresistenz.....	11
2.5 Sulfonamide.....	12
2.5.1 Chemische Eigenschaften.....	13
2.5.2 Wirkmechanismus.....	13
2.5.3 Sulfonamidresistenz.....	14
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1 Vorversuche und Methodenentwicklung.....	15
3.2 Bestimmung der KBE-Zahl .....	16
3.3 Bestimmung der Esterase-Aktivität.....	19
3.4 MHK-Bestimmung zum Nachweis resistenter Mikroorganismen.....	21
3.5 Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR.....	23
3.5.1 Durchführung der Probenaufarbeitung.....	28
3.5.2 Durchführung der DNA-Amplifikation (PCR).....	29

3.6	Untersuchte Proben und Bakterienisolate.....	31
3.6.1	Proben und Bakterienisolate aus dem Säulenversuch.....	31
3.6.2	Proben und Bakterienisolate aus dem Freilandversuch.....	33
3.6.3	Bakterienisolate aus Batchversuchen.....	34
3.6.4	Bakterienisolate von Umweltproben.....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
4.1	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen zum Säulenversuch.....	36
4.1.1	KBE-Zahlen.....	36
4.1.2	Esterase-Aktivitäten.....	38
4.1.3	MHK isolierter Bakterien.....	39
4.1.4	Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR.....	40
4.2	Resistenzuntersuchungen zum Freilandversuch.....	41
4.2.1	MHK isolierter Bakterien.....	41
4.2.2	Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR.....	42
4.3	Resistenzuntersuchungen zum Batchversuch.....	43
4.3.1	MHK isolierter Bakterien.....	43
4.3.2	Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR.....	43
4.4	Resistenzuntersuchungen von Umweltproben.....	44
4.4.1	MHK isolierter Bakterien.....	44
4.4.2	Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR.....	45
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>46</b>
5.1	Diskussion der Methoden.....	46
5.1.1	KBE-Zahl-Bestimmung.....	46
5.1.2	Esterase-Aktivität.....	47
5.1.3	MHK-Bestimmung.....	47
5.1.4	PCR.....	48
5.1.5	Vergleich von MHK-Bestimmung und PCR.....	50
5.2	Diskussion der Untersuchungsergebnisse.....	52
5.2.1	Diskussion der Ergebnisse aus den mikrobiologischen Untersuchungen des	

Säulenversuches.....	52
5.2.2 Diskussion der Resistenzuntersuchungen zum Freilandversuch.....	54
5.2.3 Diskussion der Resistenzuntersuchungen zum Batchversuch.....	55
5.2.4 Diskussion der Resistenzuntersuchungen von Umweltproben.....	56
<b>6 Fazit und Ausblick.....</b>	<b>57</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>64</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.2.1: Mögliche Eintragspfade von Antibiotika in die Umwelt [Frank 2006].....	5
Abb. 2.4.1: Grundstruktur des Tetracyclins (1,4,4a,5,5a,6,11,12a-Octahydronaphthacen) [Dürckheimer 1975].....	9
Abb.2.4.1.1: Struktur von Chlortetracyclin [Grote et al. 2004].....	10
Abb.2.4.1.2: Epimere und Isomere des Chlortetracyclins [Grote et al. 2004].....	10
Abb. 2.4.1.3:Tautomere des CTC und Epi-CTC [Michel 2005].....	10
Abb.2.5.1.1: Struktur von Sulfanilamid [Michel 2005].....	13
Abb.2.5.1.1: Struktur von Sulfadiazin (SFD) und seinem Hauptmetaboliten N <sub>4</sub> -Acetylsulfadiazin [Grote et al. 2004].....	13
Abb. 3.3.1: Fluorimeter.....	19
Abb. 3.4.1: Beispiel eines Ergebnisses einer MHK-Bestimmung.....	23
Abb. 3.5.1: Schematischer Verlauf eines PCR-Zyklus.....	24
Abb. 3.5.2: Thermocycler für die PCR.....	24
Abb. 3.5.3: Elektrophoresekammer für Gelelektrophorese.....	25
Abb. 3.6.1.1: Versuchssäule [Büchner 2006].....	32
Abb. 4.1.1.1: KBE-Zahlen von Gülle und Boden aus dem Säulenversuch.....	37
Abb. 4.1.1.2: Prozentanteil CTC-resistenter Mikroorganismen auf DEV-Agar.....	38
Abb. 4.1.2.1: Logarithmische Darstellung der Esterase-Aktivitäten der Proben aus dem Säulenversuch.....	39
Abb. 4.1.4.1: Banden mit Ribo-2-Primern auf Agarosegel.....	40
Abb. 4.1.4.2: Banden von Tet M-Primern auf Agarosegel.....	41
Abb. 4.2.2.1: Banden mit Ribo-2-Primern auf Agarosegel.....	43

# Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.1: Antibiotikaverbrauch in EU und Schweiz 1999 und 1997 [FEDESA 2001].....	4
Tab. 2.4.1: Therapeutisch wichtige Tetracycline [Dürckheimer 1975].....	7
Tab. 2.4.2: Wichtige Tetracycline [Christian 2004].....	8
Tab. 3.5.2.1: Primerpaare für verschiedene Tetracyclin-Resistenzgene [Aminov et al. 2000, Aminov et al. 2002, Aarestrup et al. 2002, Yu et al. 2005, Agerso et al. 2005].....	30
Tab. 3.5.2.2: Primerpaare der Sulfonamid-Resistenzgene [Boerlin 2005 et al.].....	30
Tab. 3.6.1.1: Proben und Bakterienisolate aus dem Säulenversuch.....	33
Tab. 3.6.2.1: Proben und Bakterienisolate aus dem Freilandversuch.....	34
Tab. 3.6.3.1: Liste der Bakterienisolate aus Batchversuchen.....	34
Tab. 3.6.4.1: Bakterienisolate von Umweltproben.....	35
Tab. 4.1.3.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus dem Säulenversuch.....	39
Tab. 4.1.4.1: Ergebnisse der PCR von Proben und Bakterienisolaten aus dem Säulenversuch.....	40
Tab. 4.2.1.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus dem Freilandversuch.....	42
Tab. 4.2.2.1: Ergebnisse der PCR von Proben und Bakterienisolaten aus dem Freilandversuch.....	42
Tab. 4.3.1.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus dem Batchversuch.....	43
Tab. 4.3.2.1: Ergebnisse der PCR von Bakterienisolaten aus dem Batchversuch.....	44
Tab. 4.4.1.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus Umweltproben.....	44
Tab. 4.4.2.1: Ergebnisse der PCR von Bakterienisolaten aus Umweltproben.....	45
Tab. 5.1.5.1: Vergleich von MHK und PCR.....	50

# Abkürzungsverzeichnis

bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Bj.	Baujahr
BO	Boden
BSA	Bovines serum albumin
CTC	Chlortetracyclin
DNA/DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
Efflux	Gene, die für Efflux-Pumpen kodieren
FDA	Fluoresceindiaceat
GW	Grundwasser
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
iCTC	iso-Chlortetracyclin
KBE	koloniebildende Einheiten
Lsg.	Lösung
MHK	minimale Hemmkonzentration
MUNLV NRW	Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmbar
OW	Oberflächenwasser
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPP	( <u>R</u> ibosomal <u>P</u> rotection <u>P</u> roteins) Gene, die für ribosomale Schutzproteine kodieren
SDS	Natriumdodecylsulfat-Lsg.
SFD	Sulfadiazin
SR	Starkregen (Beregnungsereignis beim Säulenversuch)
Sul	Sulfonamid-Resistenzgen
TC	Tetracyclin
TE-Puffer	DNA-Lösungspuffer
Tet	Tetracyclin-Resistenzgen
E-Wasser	vollentsalztes Wasser





# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Antibiotika werden schon seit über 60 Jahren in der Humanmedizin und seit mehr als 40 Jahren auch in der Veterinärmedizin eingesetzt [Falbe et al. 1992]. Als einzige Waffe gegen viele verschiedene vor allem bakterielle Infektionen sind Antibiotika unersetzlich. Ein unsachgemäßer Einsatz dieser Medikamente birgt aber Gefahren. Denn nach der Applikation werden die meisten Antibiotika bzw. deren Metaboliten von Mensch und Tier fast vollständig wieder ausgeschieden. Über verschiedene Eintragspfade können die Antibiotika in die Umwelt gelangen [Hamscher et al 2002]. Dort kommt es zur Kontamination von Böden und Gewässern durch die Wirkstoffe und ihre Metaboliten. Die Antibiotika werden mit Gülle oder Klärschlamm auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ausgebracht und können in Gewässer, Grund- und Trinkwasser eingetragen werden. Bei Kontakt zu Mikroorganismen können Antibiotika zur Induktion von Resistenzen führen. Die Konzentrationen in der Umwelt liegen meist unterhalb der Effektkonzentrationen [Thiele-Bruhn 2003a]. Aber gerade diese subtherapeutischen Dosen begünstigen eine Selektion resistenter Stämme. Diese Resistenzen können sich in der Umwelt durch verschiedene Mechanismen weiterverbreiten und im schlimmsten Falle sogar auf humanpathogene Mikroorganismen übertragen werden. Antibiotika, die in der Humanmedizin gegen bakterielle Infektionen eingesetzt werden, könnten dadurch wirkungslos werden [Höper et al. 2002]. Es liegen bisher nur wenige Untersuchungen zum Vorkommen und Verhalten von Tierarzneimitteln in der Umwelt vor. Bei der Einschätzung der Resistenzproblematik gibt es erheblichen Forschungsbedarf. Auch praktikable Untersuchungsmethoden zur Bestimmung von Antibiotika und ganz besonders von Resistenzen sind wenig beschrieben.

## **1.2 Veranlassung**

Innerhalb des Projektes „Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes“ des Ministeriums für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes NRW (MUNLV NRW) das vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Paderborn geleitet wird, ist die hier vorliegende Arbeit am Institut für Wasserforschung (IfW) angefertigt worden. Das Ziel des Projektes am IfW ist es, Informationen zum Transportverhalten und zu den Auswirkungen der ausgewählten Antibiotika Chlortetracyclin und Sulfadiazin in Boden und Grundwasser zu erhalten und die Einflüsse der Antibiotika auf die Umwelt zu bewerten. In einem Teilvorhaben dieses Projektes wurde ein Säulenversuch durchgeführt, bei dem der Auftrag von Gülle auf einen Ackerboden und darauf folgende, unterschiedliche Niederschlagsereignisse simuliert wurden. Die eingesetzte Gülle, der Boden und die Sickerwasserproben, die nach den Niederschlagsereignissen genommen wurden, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf verschiedene mikrobiologische Parameter und vor allem auf das Vorkommen resistenter Organismen hin untersucht. Weiterhin wurden Boden- und Wasserproben auf das Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien und die auftretenden Resistenzgene untersucht, um feststellen zu können, in wie weit der Eintrag von Antibiotika in die Umwelt zur Ausbildung von Resistenzen beiträgt.

## **1.3 Ziel der Arbeit**

Die Themenstellung dieser Diplomarbeit beinhaltet vor allem die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von resistenten Mikroorganismen und von Resistenzgenen. Dazu sollten zuerst die am IfW vorhandenen Methoden auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft und neue Methoden etabliert werden. Die Verfahren zur Bestimmung der KBE-Zahl und der Esterase-Aktivität sollten durchgeführt werden. Eine Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) sollte nach DIN-Norm aufgebaut und zum Nachweis antibiotikaresistenter Mikroorganismen eingesetzt werden. Zur Bestimmung der zugrundeliegenden Resistenzgene wird eine PCR-Methode entwickelt und etabliert.

Danach sollte die Anwendbarkeit der Methoden zur Bestimmung resistenter Mikroorganismen gegen die Antibiotika Chlortetracyclin und Sulfadiazin für verschiedene Proben (Gülleproben, Bodenproben, Wasserproben) überprüft werden.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Antibiotika

Antibiotika (griechisch: antibios: gegen Leben) sind Stoffe mikrobiologischer Herkunft die Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmen oder sie abtöten [Fallert-Müller 2000]. Der Begriff Antibiotika gilt ursprünglich nur für die entsprechenden pharmazeutischen Wirkstoffe, die von Bakterien und Pilzen ausgeschieden werden. Heute fallen auch die synthetisch hergestellten Antibiotika (Chemotherapeutika), wie z. B. die Sulfonamide, in diese Wirkstoffgruppe [Thiele-Bruhn et al. 2003b, Gräfe 1992].

Die Entdeckung des ersten Antibiotikum, Penicillin, machte der Arzt Alexander Fleming bereits im Jahre 1928, als er bemerkte, dass in der Umgebung des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* keine Staphylokokkenkulturen wachsen konnten. Aber erst im Jahre 1938 nahmen der Pathologe Howard Florey und der Chemiker Ernst Chain die Beobachtungen Flemings auf und isolierten das Penicillin, um es beim Menschen gegen bakterielle Infektionen anzuwenden. 1945 erhielten Fleming, Florey und Chain den Nobelpreis für ihre Entdeckung. Zu dieser Zeit wurde das Penicillin schon großtechnisch hergestellt und in den USA vielfach eingesetzt.

In den folgenden Jahren wurden viele weitere Antibiotika aus Bakterien und Pilzen isoliert und auf ihre Anwendbarkeit gegen verschiedene Infektionskrankheiten getestet. So wurde unter anderem das Tetracyclin 1948 von Duggar isoliert [Dürckheimer 1975].

Chemisch gesehen kann man die Antibiotika nicht einer bestimmten Klasse zuordnen, sie sind heterogen. Durch ihre komplexe Struktur sind sie in ihrem Umweltverhalten variabel und zeigen je nach pH-Wert verschiedene ionische Eigenschaften [Thiele-Bruhn et al. 2003b]. Wirkstoffe die zu den Antibiotika gezählt werden, gehören zu den unterschiedlichsten Stoffklassen und können aus Aminosäuren, Zucker und Zuckerderivaten, tetrazyklischen Triterpenen, Nucleosiden uvm. aufgebaut sein.

Antibiotika werden im allgemeinen nach wenigen Tagen aus dem Körper in unveränderter Form oder als Metabolite ausgeschieden. Gelangen sie in die Umwelt, spielt die hohe Stabilität von Antibiotika gegen unterschiedliche pH-Werte und Enzyme eine wichtige Rolle, da sie dadurch eine hohe Persistenz, also Umweltstabilität, in Wasser und vor allem im Boden aufweisen

[Thiele-Bruhn et al. 2003b]. Eine gewisse Wasserlöslichkeit befähigt die meisten Antibiotika zur Mobilität in der aquatischen Umwelt, wodurch sie in andere Kompartimente gelangen können [Hamscher 2003].

Zum Einsatz von Veterinärantibiotika liegen nur wenige Zahlen vor. Die meisten veröffentlichten Statistiken beschränken sich auf regionale Schätzungen, die auf Informationen der Tierärzte beruhen. Repräsentativ sind lediglich die von der FEDESA 2001 veröffentlichten Verbrauchsmengen für Antibiotika in der EU und der Schweiz (Tab. 2.1.1). 1999 sind laut dieser Statistik in der EU und in der Schweiz 13216 t Antibiotika eingesetzt worden, davon 8528 t in der Humanmedizin und 4688 t in der Veterinärmedizin. Die starke Abnahme von 50% beim Einsatz der Antibiotika als Leistungsförderer ist damit zu erklären, dass dies seit 1997 gesetzlich verboten ist. Die Abnahme dieser Verwendung wird aber durch die Erhöhung des Einsatzes in der Tiermedizin relativiert.

Tab. 2.1.1: Antibiotikaverbrauch in EU und Schweiz 1999 und 1997 [FEDESA 2001]

	1999		1997		Veränderung
	in t/Jahr		in t/Jahr		1999 zu 1997
Gesamt	13216		12752		+ 3,6%
Humanmedizin	8528	65%	7659	60%	+ 11,3%
Tiermedizin	3902	29%	3494	27,5%	+ 11,0%
Leistungsförderer	786	6%	1599	12,5%	- 50,0%

## 2.2. Eintrag von Antibiotika in die Umwelt

Antibiotika, die in der Humanmedizin verabreicht werden, gelangen über die Ausscheidungen ins Abwasser. Die humanen Abwässer werden vor allem den Kläranlagen zugeführt, in denen weiterer Kontakt zu einer Vielzahl von Mikroorganismen gewährleistet ist, was zur Induktion und Weiterverbreitung von Resistenzen führen kann [Feuerpfeil et al. 1999]. In der Kläranlage werden viele Antibiotika nicht oder nicht ausreichend zurückgehalten, so dass sie mit dem Kläranlagenablauf in Oberflächengewässer gelangen oder mit dem Klärschlamm als Dünger auf Böden aufgebracht werden. Von den gedüngten Böden ist eine Abschwemmung in Oberflächengewässer oder aber eine Versickerung bis ins Grundwasser möglich. Aus Oberflächenwasser und aus Grundwasser wird Trinkwasser gewonnen, mit dem Mensch und Tier die Antibiotika wieder aufnehmen können.

Die in der Veterinärmedizin verabreichten Antibiotika werden vom Tier zum Teil wieder ausgeschieden und kommen so in die Gülle oder in den Stallmist [Grote et al. 2004]. Durch Mist- und Gülleausbringung gelangen sie vor allem in den Boden. Von dort aus können sie zum einen in angebaute Feldfrüchte aufgenommen werden oder aber durch Oberflächenabfluss (run off) vom Ackerboden in Oberflächenwasser abgeschwemmt und durch Versickern in das Grundwasser ausgewaschen werden [Grote et al. 2004] (Abb. 2.2.1). Die im Boden und im Wasser lebenden Bakterien haben Kontakt zu den Antibiotika, wodurch es dort zur Induktion von Resistenzen und einem Selektionsvorteil resistenter Bakterien kommen kann. Die Hauptursache der Verbreitung von Resistenzen ist, dass resistente Bakterien aus dem Darm von Mensch und Tier über deren Ausscheidungen in die Umwelt gelangen und dort durch den Selektionsdruck der vorhandenen Antibiotika zum Verbleib und zur Verbreitung der Resistenzen führen können [Feuerpfeil et al. 1999].

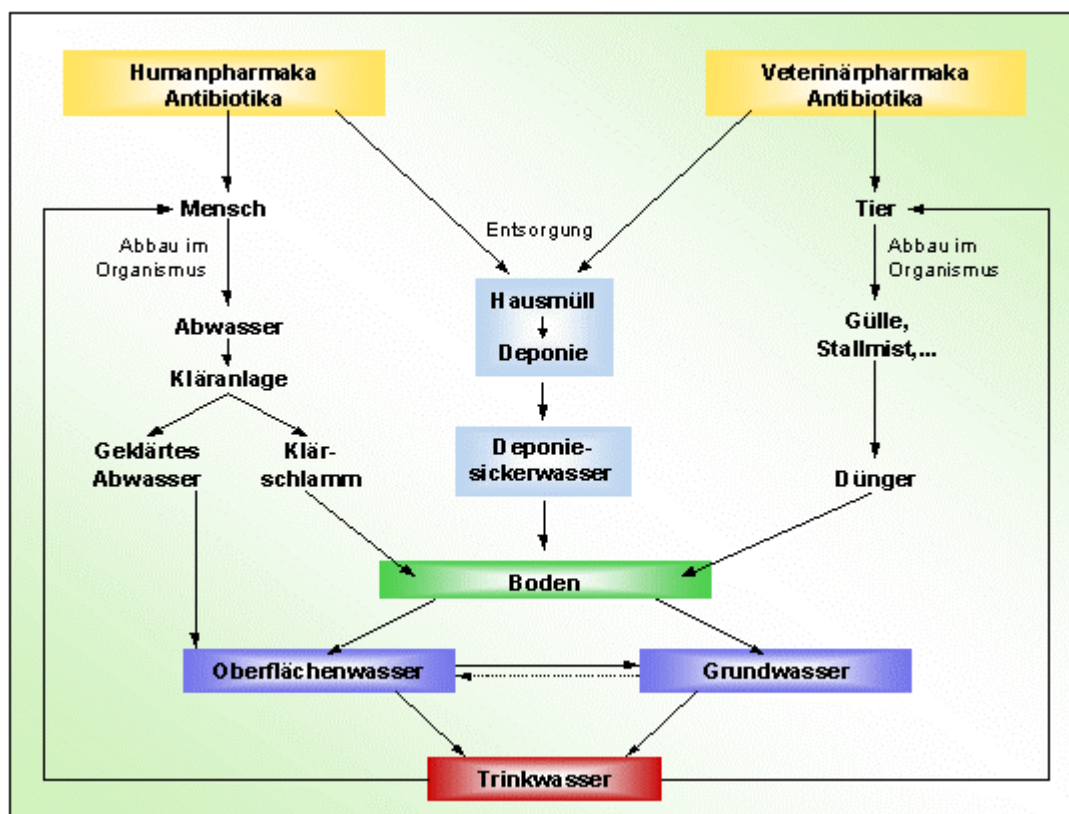


Abb. 2.2.1: Mögliche Eintragspfade von Antibiotika in die Umwelt [Frank 2006]

## 2.3. Antibiotikaresistenzen

Schon 1947 hatte der Entdecker des Penicillins, Alexander Fleming, in einem Interview mit der New York Times davor gewarnt, dass Bakterien unter bestimmten Umständen gegen Antibiotika resistent werden können [Dreifert 1999]. Diese Resistenzen können, wie man heute weiß, durch eine einfache Mutation oder durch den Austausch komplexer Genstrukturen entstehen. Die Antibiotika-Resistenzgene liegen zu 95% auf mobilen genetischen Elementen, Plasmiden oder Transposons. Die Weitergabe von Resistenzen kann auch zwischen unterschiedlichen Bakterienarten erfolgen und geschieht über drei verschiedene Wege:

- Transformation: aus dem extrazellulären Raum aufgenommene Fremd-DNA wird ins Genom des Bakteriums eingebaut
- Transduktion: genetisches Material wird über Phagen weitergegeben
- Konjugation: manche Bakterien sind dazu fähig, über sogenannte F-Pili einen „Kontaktkanal“ zu einem anderen Bakterium aufzubauen und darüber genetisches Material z.B. in Form von Plasmiden weiterzugeben [Dürckheimer 1975]. Dieser sogenannte horizontale Gentransfer kann auch zwischen Bakterien völlig unterschiedlicher taxonomischer Zugehörigkeit vorkommen.

Durch den Eintrag von Antibiotika und deren Metaboliten in die aquatische Umwelt ist ein Beitrag zur zunehmend beobachteten Resistenz von Bakterien gegen Antibiotika möglich [Engels 2004]. In den meisten Untersuchungen die bisher gemacht worden sind, konnte festgestellt werden, dass nicht der Eintrag der Antibiotika selbst, sondern vielmehr der Eintrag von resistenten Bakterien aus der Darmflora von Mensch und Tier direkt in die Umwelt der Hauptgrund für die allgemein bestätigte Zunahme von Antibiotikaresistenzen ist [Thiele-Brunn 2003a, Kümmerer et al. 2004]. In Anwesenheit von Antibiotika haben die resistenten Bakterien einen Selektionsvorteil und vermehren sich daher stärker als die nicht resistenten. Besonders in der Intensivtierhaltung gelangen antibiotikaresistente Bakterien über die Ausscheidungen in die Gülle und später dann auf den Boden [Feuerpfeil et al. 1999]. Auch die Ausscheidungen von Menschen können antibiotikaresistente Bakterien enthalten, diese werden dann über die Kläranlagen wieder in die Umwelt entlassen [Feuerpfeil et al. 1999]. Die Weiterverbreitung von resistenten Bakterien vom Boden ins Wasser und über das Wasser direkt zum Menschen oder in Nahrungsmittel ist momentan ein viel diskutiertes Thema, muss aber für jedes Antibiotikum separat betrachtet werden, da dessen stoffspezifische Eigenschaften einen entscheidenden Einfluss auf die Persistenz und Mobilität haben [Thiele-Bruhn et al. 2003b].

Zur Einteilung der Bakterien in resistente und sensible sind in der DIN 58940 normierte Nachweisverfahren aufgeführt.

## 2.4 Tetracycline

Als erstes Tetracyclin isolierte B. M. Duggar 1948 das Chlortetracyclin aus dem Bakterium *Streptomyces aureofaciens* und benannte es nach dem Bakterium aus dem es isoliert worden ist Aureomycin [Dürckheimer 1975]. Die Ausgangsverbindung für spätere Wirkstoffe, das Tetracyclin, stellte man damals durch die katalytische Hydrierung des Aureomycin her. Heute wird Tetracyclin direkt durch Fermentation gewonnen. Die in der folgenden Zeit immer größer werdenden Ansprüche an die Antibiotika in bezug auf Toxizität, Pharmakokinetik, Stabilität, Reinheit, Eigenschaften der Metaboliten, usw. führten zur Entwicklung weiterer Tetracycline. Die therapeutisch wichtigen Wirkstoffe (Tab. 2.4.1) unterscheiden sich nur durch die unterschiedlichen Substituenten R1, R2, R3 und R4 (Tab. 2.4.2, Abb. 2.4.1) und die damit verbundenen Eigenschaften. Heute werden die Tetracycline in der Humanmedizin nicht mehr so häufig eingesetzt, sie spielen aber in der Veterinärmedizin eine große Rolle. Der Großteil der Tetracycline wird in der Schweinezucht und dort vor allem in der Massentierhaltung eingesetzt, um dort der Ausbreitung von Krankheiten auf die anderen Tiere vorzubeugen. Von den 4688 t Antibiotika, die 1999 bei Tieren eingesetzt worden sind, waren ungefähr zwei Drittel Tetracycline [FEDESA 2001].

Tab. 2.4.1: Therapeutisch wichtige Tetracycline [Dürckheimer 1975]

chem. Bez.	Abkürz.	Handelsnamen	erste Synthese
Chlortetracyclin	CTC	Aureomycin	1948
Oxytetracyclin	OTC	Terramycin, Terravenös, Vendarein, Macocyn	1950
Tetracyclin	TC	Achromycin, Hostacyclin, Supramycin, Tefilin	1953
Desmethylchlortetracyclin	DMCT	Ledermycin	1957
Rolitetracyclin	PMT	Reverin	1956
Methacyclin	MOTC	Randomycin	1961
Doxycyclin	DOOTC	Vibramycin, Vibravenös	1963
Minocyclin	MITC	Klinomycin	1967

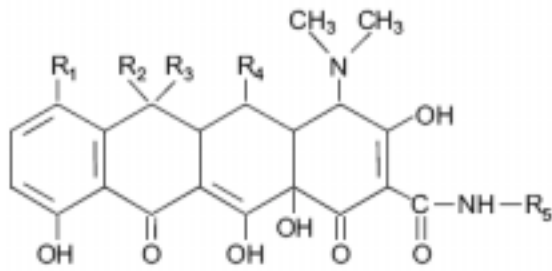


Abb. 2.4.1: Grundstruktur des Tetracyclins (1,4,4a,5,5a,6,11,12a-Octahydronaphthacen) [Dürckheimer 1975]

Tab. 2.4.2: Wichtige Tetracycline [Christian 2004]

chem. Bez.	Abkürz.	R1	R2	R3	R4	R5
Tetracyclin	TCY	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	H
Chlortetracyclin	CTC	Cl	OH	CH <sub>3</sub>	H	H
Oxytetracyclin	OTC	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H
Doxycyclin	DCY	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	H
Minocyclin	MCY	H	H	H	H	H

Die Tetracycline sind durch die gute Verträglichkeit des Wirkstoffs und das breite Wirkungsspektrum neben dem Penicillin das meist verabreichte Antibiotikum. Beim Menschen wurden Tetracycline vor allem in der antimikrobiellen Chemotherapie, bei bakteriellen Infektionen (Atemwege, Magen-Darm-Trakt, Haut, Urogenitaltrakt), aber auch bei Pest und Cholera eingesetzt. Heute gelten die Tetracycline nicht mehr als Mittel der ersten Wahl. Seit den 70er Jahren werden Tetracycline verstärkt in der Veterinärmedizin bei bakteriellen Infektionen des Respirations-, Verdauungs- und Gastrointestinaltraktes eingesetzt [Sattelberger et al. 2005]. Im Zuge des vermehrten Einsatzes in der Nutztierhaltung und dort auch vor allem als Futterzusatz zur Wachstumsförderung, was allerdings seit 1997 in Deutschland gesetzlich verboten ist, kommt es immer öfter zur Ausbildung von resistenten Bakterien gegen Tetracycline.

Die Tetracycline werden zu ca. 65% nach 7-10 Tagen unmetabolisiert mit dem Kot ausgeschieden und gelangen so in die Gülle, in der sie äußerst persistent sind [Thiele-Brunn 2003a]. So zeigen Winckler und Grafe in ihren Laboruntersuchungen das nach 7 Wochen maximal 50% des Tetracyclins in einer Gülleprobe abgebaut wird [Winckler et al. 2000]. In den Screeninguntersuchungen von Winkler und Grafe sind Tetracyclinegehalte bis zu 66 mg/kg in Schweinegülle gemessen worden. In mit Gülle beaufschlagten Böden konnte das Tetracyclin in

Bodentiefen bis zu 40 cm mit Konzentrationen bis zu 32,2 µg/kg (CTC 26,4 µg/kg) nachgewiesen werden [Hamscher et al. 2000]. Auch im Boden können Tetracycline unter Umweltbedingungen über Monate persistieren [Höper et al. 2002]. In einer Studie fanden Hamscher et al. 2002 sogar eine maximale Konzentration von 0,31 mg/kg Tetracyclin in einer Ackerbodenprobe wieder. In verschiedenen Oberflächengewässern, die durch Oberflächenabfluss von mit Gülle beaufschlagten Äckern belastet werden, können auch höhere Konzentrationen bis zu 1 µg/l nachgewiesen werden [Hamscher 2003]. Ein Transport von gelöstem Tetracyclin in das Grundwasser ist kaum zu erwarten, da die Bodenpassage nur sehr gering ist [Thiele-Bruhn et al. 2003b]. Diese durch die starke Bindung der Tetracycline an Bodenpartikel zu erklärende Barriere bewirkt selbst bei sehr hohen Tetracyclin-Konzentrationen in Oberböden, dass in tieferen Bodenschichten keine Tetracycline nachgewiesen werden können [Hamscher et al. 2002].

### **2.4.1 Chemische Eigenschaften**

Die Grundstruktur der Tetracycline ist ein System aus vier linear anellierten sechsgliedrigen Ringen (Naphthacen-Grundgerüst), die eine charakteristische Anordnung der Doppelbindungen aufweisen (Abb. 2.4.2).

Tetracycline sind gelbliche, kristalline, geruchlose, bitterschmeckende Verbindungen [Engels 2004]. Sie zersetzen sich sehr schnell durch UV-Licht. Sie sind schwer wasserlöslich im physiologischen pH-Bereich (ca. 1 g/l) und aufgrund ihrer sauren Gruppen am basischen Diethylamino-Rest verhalten sie sich amphoter [Dürckheimer 1975]. Tetracycline bilden schwerlösliche, reversible Chelate mit zwei- und dreiwertigen Kationen und anderen nieder- und hochmolekularen Substanzen (Neumeister et al. 1997).

In kristalliner Form sind die Tetracycline stabil, aber in wässriger Lösung können sie durch Licht-, pH- oder Temperatureinflüsse umgewandelt werden [Michel 2005]. Die möglichen Umwandlungsprodukte von Chlortetracyclin (Abb. 2.4.1.1) bei verschiedenen Bedingungen sind in Abb. 2.4.1.3. gezeigt. Unter Wasserabspaltung bei niedrigem pH-Wert kann sich das CTC zum Anhydrochlortetracyclin umwandeln. Schon bei leicht alkalischem pH-Wert von 7,5 erfolgt eine Umwandlung des CTC zum Isochlortetracyclin. Die Umwandlungsprodukte unterliegen wiederum einer Epimerisierung.

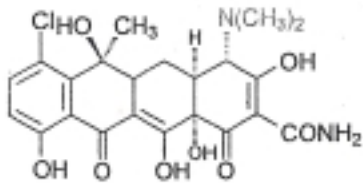


Abb.2.4.1.1: Struktur von Chlortetracyclin [Grote et al. 2004]

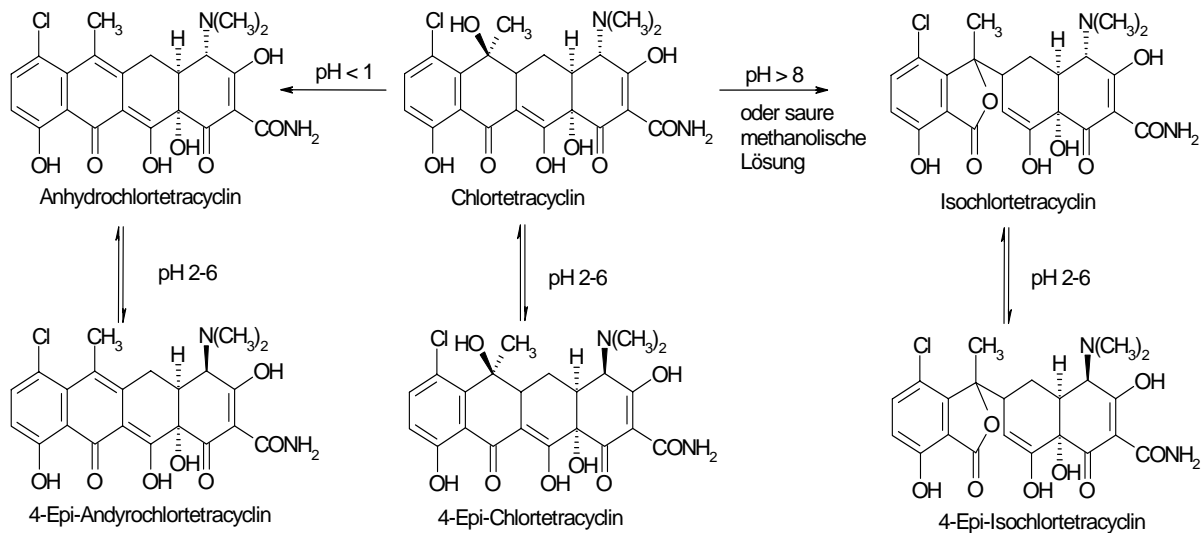


Abb.2.4.1.2: Epimere und Isomere des Chlortetracyclins [Grote et al. 2004]

Weitere Untersuchungen zeigten eine Keto-Enol-Tautomerie des Chlortetracyclins und des Epichlortetracyclins (Abb. 2.4.1.3) [W. Naidong et al. 1990]. Das Gleichgewicht der Keto-Enol-Tautomere hängt von pH-Wert, Temperatur und Konzentration ab.

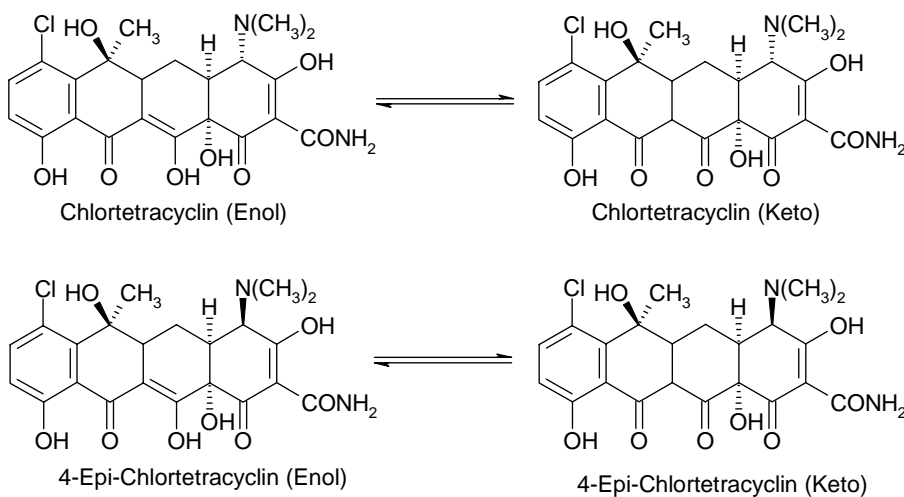


Abb. 2.4.1.3: Tautomere des CTC und Epi-CTC [Michel 2005]

Tetracyclin kommt im Wasser nur als Komplexverbindung mit 2-wertigen Ionen vor, dort aber auch nur in sehr geringen Konzentrationen vor [Hamscher 2003]. Tetracyclin sorbiert stark an

Bodenpartikel und ist daher von durchfließendem Sickerwasser nur schwer auszuwaschen (geringe Mobilität) [Hamscher et al. 2000].

## **2.4.2 Wirkmechanismus**

Die Tetracycline wirken hemmend auf die Proteinbiosynthese von gramnegativen und grampositiven Bakterien [Winkler et al. 2004]. Sie wirken abtötend (bakteriostatisch). Der Wirkstoff bindet an die 30 S Untereinheit des 70 S Ribosoms und verhindert dadurch die Codon-Anticodon-Interaktion zwischen Ribosom und der Aminoacyl-tRNA. Dadurch kann die mRNA nicht mehr zum Bestimmungsort gelangen und die Synthese des entsprechenden Proteins kann nicht mehr durchgeführt werden.

Tetracycline hemmen auch die Zellwandbiosynthese und, durch ihre Eigenschaft mit Metallionen zu chelatisieren, können sie Calcium binden [Falbe et al. 1992].

## **2.4.3 Tetracyclinresistenz**

In den letzten Jahren gab es einige Untersuchungen zur Tetracyclin-Resistenz. Der größte Teil der Veröffentlichungen zu diesem Thema bezieht sich auf die Gene, die für die Resistenz kodieren. Es wurden mittlerweile 36 verschiedene Tetracyclin-Resistenzgene nachgewiesen (Anhang A)[Chopra, Roberts 2001, Roberts 2006]. Die Informationen über die einzelnen Resistenzgene sind unterschiedlich umfangreich. Für die meisten Tetracyclin-Resistenzgene sind nur wenige Informationen veröffentlicht, da sie selten vorkommen. Aber für die häufig gefundenen Gene wie z.B. das Tet M gibt es viele teilweise auch widersprüchliche Informationen. Das Resistenzgen Tet M ist in den Bakterienklassen Enterococcus, Enterobacter, Acinetobacter, Vibrio, Pseudomonas, E. coli, Lactobacillus, Streptococcus, Pasteurella uvm. nachgewiesen worden [Chopra, Roberts 2001, Roberts 2006]. Die durch Tet M bedingte Resistenz wird durch Veränderungen an der Struktur der Ribosomen hervorgerufen (s.u. RPP). Andere Tetracyclin-Resistenzgene kodieren für Efflux-Pumpen, die den Wirkstoff aus der Zelle hinaus befördern.

Der Nachweis der Gene mit der PCR-Methode ist in einigen Veröffentlichungen beschrieben. Es sind unterschiedliche Primer und auch unterschiedliche Temperaturprogramme in der Literatur postuliert [Yu et al. 2005, Aminov et al. 2000, Agero et al. 2002]. Die Anhänge A und B zeigen

die nach einer Literaturrecherche zusammengefassten Informationen zu den Tetracyclin-Resistenzgenen.

Man unterscheidet bei der Resistenz gegen Tetracycline im wesentlichen drei verschiedene Mechanismen [Chopra, Roberts 2001, Helmuth 1999]:

- durch Veränderung der Bindungsstelle am 70 S Ribosom kann sich das Tetracyclin nicht anlagern (Ribosomal Protection Protein: RPP)
- Transportproteine, sog. Efflux-Proteine, die in der Membran eingelagert sind, verringern die Tetracyclin-Konzentration in der Zelle durch aktiven Stofftransport des Tetracyclins in den extrazellulären Raum
- durch Ausschüttung von Enzymen wird die Modifikation des Tetracyclins verändert

## 2.5 Sulfonamide

Die Sulfonamide sind Chemotherapeutika und werden synthetisch hergestellt. Das einfachste Sulfonamid, das Sulfanilamid, wurde bereits 1908 vom Chemiker Gelmo synthetisiert, aber erst 1935 erkannte Domagk den medizinischen Nutzen der Sulfonamide [Falbe et al. 1992].

Die Sulfonamide werden heute in der Humanmedizin noch in Kombination mit Trimethoprim zur Behandlung von Harn- und Atemwegsinfektionen eingesetzt [Sattelberger 1999]. In der Veterinärmedizin werden Sulfonamide gegen Durchfall sowie bakterielle Infektionen des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes eingesetzt [Sattelberger et al. 2005].

Sulfonamide werden 1-2 Tage nach der Applikation nahezu vollständig ausgeschieden und gelangen so in die Gülle [Sattelberger et al. 2005]. Ungefähr die Hälfte des Sulfonamids liegt als N<sup>4</sup>-Acetyl-Derivate vor, wird aber in der Gülle innerhalb von 21 Tagen fast vollständig durch Mikroorganismen reaktiviert. Erst danach nimmt die Konzentration in der Gülle kontinuierlich ab [Berger et al. 1986]. In der Gülle wurden Sulfonamide in Konzentrationen bis zu 11,3 mg/ kg, im Boden mit bis zu 98 µg/kg nachgewiesen [Höper et al. 2003; Kreuzig et al. 2005]. In Grundwasser und Drainagen wurden Sulfonamide in Konzentrationen bis zu 0,017 µg/l nachgewiesen [Sacher et al. 2002]. Die Sulfonamide zeichnen sich durch eine hohe Mobilität aus, sie können aus dem Boden in Oberflächen- oder Grundwasser ausgewaschen werden.

## 2.5.1 Chemische Eigenschaften

Sulfonamide enthalten eine primäre aromatische Aminogruppe und ein Amid, das einen variablen Rest aufweist. Abbildung 2.5.1.1 zeigt das einfachste Sulfonamid, das Sulfanilamid. Die zwei Aminogruppen haben unterschiedliche pK-Werte. Daher sind Sulfonamide im sauren pH-Bereich positiv und im basischen pH-Bereich negativ geladen [Stettler 2004]. Die Wasserlöslichkeit der Sulfonamide hängt stark vom pH-Wert ab. Bei neutralem pH liegt sie bei ca. 1 g/l. Nur im stark basischen oder stark sauren pH-Bereich bilden sich besser wasserlösliche Salze [Halling-Sorensen et al. 1998].

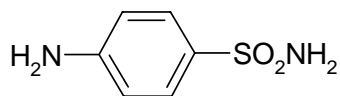


Abb.2.5.1.1: Struktur von Sulfanilamid [Michel 2005]

Das in dieser Arbeit untersuchte Sulfonamid Sulfadiazin (SFD) kann zum N4-Acetylsulfadiazin umgewandelt werden (Abb. 2.5.1.2). Die Umwandlung ist reversibel.

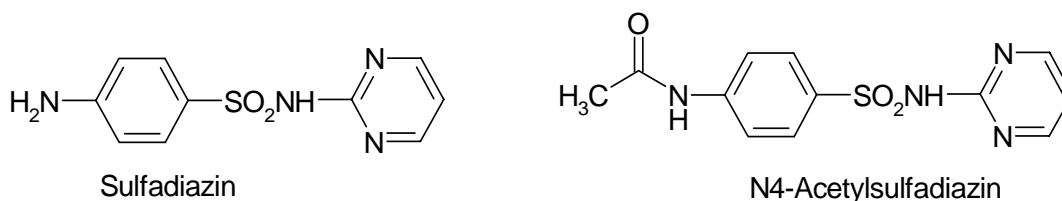


Abb.2.5.1.1: Struktur von Sulfadiazin (SFD) und seinem Hauptmetaboliten N<sub>4</sub>-Acetylsulfadiazin [Grote et al. 2004]

## 2.5.1 Wirkmechanismus

Die 4-Aminobenzolsulfonamido-Gruppe der Sulfonamide ist für die bakteriostatische (hemmende) Wirkung des Antibiotikums verantwortlich. Die Sulfonamide hemmen die Synthese der Folsäure von gramnegativen und grampositiven Bakterien kompetitiv. Durch Besetzen der Bindungsstelle für die ähnlich gebaute 4-Aminobenzoessäure, wird die Synthese der Folsäure blockiert. Durch den daraus resultierenden Mangel an Folsäure wird die Synthese von DNA und RNA nach einigen Stunden beeinträchtigt (Neumeister et al. 1997). Die Vermehrung der Bakterien wird gestoppt und die Monocyten sind in der Lage, die Bakterien durch Phagozytose abzubauen.

### 2.5.3 Sulfonamidresistenz

Es gibt 3 verschiedene Gene die für eine Sulfonamid-Resistenz kodieren: Sul 1, Sul 2, Sul 3 [Boerlin et al. 2005]. Im Gegensatz zu den Tetracyclin-Resistenzgenen gibt es nicht annähernd so viele Informationen. Den einzelnen Genen können noch nicht die entsprechenden Mechanismen zugeordnet werden. 2005 wiesen Boerlin et al. die drei Resistenzgene in E.coli-Isolaten von Schweinen nach. Im Anhang C sind die vorhandenen Informationen zu den 3 Sulfonamid-Resistenzgenen zusammengefasst. Es gibt noch keine Informationen über das Auftreten von Sulfonamid-Resistenzgenen in Boden und Wasser.

Bei den Sulfonamiden unterscheidet man im wesentlichen drei verschiedene Resistenzmechanismen [P. Huovinen et al. 1995]:

- die Bindungsstelle für das Enzym Dihydropteroinsäuresynthetase wird so verändert, dass eine niedrigere Affinität zum Sulfonamid besteht
- durch Erhöhung der Produktion von 4-Aminobenzoessäure kann die Bindung des Sulfonamids verringert werden
- durch Erhöhung der Metabolisierungsrate werden mehr Sulfonamide inaktiviert

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Vorversuche und Methodenentwicklung

Die Vorversuche sollten zeigen, welche Aussagen die einzelnen Methoden über die Proben ermöglichen. Auch die Eignung der Verfahren in bezug auf verschiedene Probenarten (Gülle, Boden, wässrige Proben, Mikroorganismen) sollte überprüft werden. Die genaue Beschreibung der Methoden ist in den weiteren Kapiteln zu finden.

Am IfW sind die Methoden zur Bestimmung der Koloniezahl auf Standardnährböden (Bestimmung der KBE-Zahl) und zur Bestimmung der Esterase-Aktivität bereits seit Jahren eingesetzte Methoden und wurden zur mikrobiologischen Untersuchung der Proben aus dem Säulenversuch eingesetzt, da beide Verfahren zur Beurteilung der mikrobiellen Besiedlung gut geeignet sind. Zur Quantifizierung resistenter Mikroorganismen in Proben wurde eine Modifikation der Bestimmung der KBE-Zahl angewendet. Dazu wurden den Nährmedien die zu untersuchenden Antibiotika zugesetzt und die darauf wachsenden Kolonien in Relation zu den auf antibiotikafreien Nährmedien wachsenden Mikroorganismen gesetzt. Da die Methode kein genormtes Verfahren ist, wurde zusätzlich die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mit der Agar-Dilutionsmethode nach DIN 58940-6 eingeführt. Hierzu wurden zuvor auf DEV-Agar kultivierte Bakterienisolate der Proben eingesetzt. Mit dieser Methode ist eine eindeutige Bestimmung resistenter Mikroorganismen möglich. Eine Aussage über die Zahl der vorhandenen resistenten Mikroorganismen ist nicht möglich.

Zur Untersuchung der zugrundeliegenden Resistenzgene sollte eine PCR-Methode entwickelt werden. Zur Methodenentwicklung wurde eine eingehende Literaturrecherche durchgeführt. Zum Nachweis von Resistenzgenen benötigt man spezifische Primer, die als Anfangspunkt der PCR-Amplifikation dienen. Diese Primer wurden der Literatur entnommen. Es wurden die Primerpaare für Tet H und Tet L (Efflux-Resistenzgene), sowie für die RPP-Resistenzgene Tet M, Tet O, Tet Q und Tet W eingesetzt. In der Literatur genannte Temperaturprogramme wurden ebenfalls übernommen. Als weiterer Primer wurde ein stark degenerierter Primer eingesetzt, der ein Amplicon von 7 verschiedenen RPP-Resistenzgenen gegen Tetracycline amplifiziert.

Der Einsatz der PCR zur Bestimmung von Sulfonamid-Resistenzgenen ist mit den Primern, die in der Literatur für Sulfonamide genannt sind, Sul 1, Sul 2 und Sul 3 durchgeführt worden.

### 3.2 Bestimmung der KBE-Zahl

Mit der Bestimmung der KBE-Zahl wird die Lebendbakterienzahl auf gering selektiven Nährböden erfasst. Unter definierten Wachstumsbedingungen wird auf einem Nähragar die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) ausgezählt. Als KBE wird eine Zelle oder ein Zellhaufen definiert, die unter den vorgegebenen Bedingungen in der Lage ist eine Kolonie durch Zellteilung zu entwickeln. Die Anzahl der KBE muss auf das eingesetzte Probenvolumen bezogen werden [Bast 1999].

Geräte:

Autoklav:

Nährmedienautoklav Varioklav Typ 500 Tisch, Bj. 1997, H + P Labortechnik, Seriennr. 59351296

Sterilbank:

Prettl-Sicherheitswerkbank Typ MRF 1600, Goller Reinraumtechnik

Brutschrank:

Brutschrank, Binder, Seriennr. 05-77620

Chemikalien:

- DEV-Agar-Fertigpulver (Merck, 1.11471.5000)
- R2A-Agar-Fertignährmedium (Merck, 1.00416.0500)
- Endo-Agar-Fertignährmedium (Difco, 0736.17)
- VE-Wasser
- Chlortetracyclin (Riedel-de Haen, 46133)
- Sulfonamid (Riedel-de Haen, 35033)
- iso-Chlortetracyclin (Acros Organics, 268211000)

Antibiotikastammlösung:

- 50 mg des Antibiotikum (Chlortetracyclin, iso-Chlortetracyclin bzw. Sulfadiazin) in 50 ml-Messkolben einwiegen und mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen (Konzentration: 1 mg/ml)
- ggf. nicht gelöstes Antibiotikum im Ultraschallbad lösen
- Lösung im Kühlschrank lagern

Lösung vor Gebrauch gut schütteln und steril filtrieren!

## Herstellung der Nährmedien:

### **DEV-Agar:**

- 43 g/l Fertigpulver (Merck, 1.11471.5000) mit VE-Wasser aufkochen
- 15 min bei 121°C autoklavieren
- temperieren auf 50°C
- unter der Sterilbank in sterile Petrischalen gießen
- Aufbewahrung im Kühlschrank und vor Licht geschützt

### Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch 10,0 g/l

Fleischextrakt 10,0 g/l

Natriumchlorid 5,0 g/l

Agar-Agar 18,0 g/l

### **R2A-Agar:**

- 15,2 g pulverförmiges Fertignährmedium (Merck, 1.00416.0500) in 1 l VE-Wasser lösen und kurz aufkochen
- 15 min bei 121°C autoklavieren
- temperieren auf 50°C
- unter der Sterilbank in sterile Petrischalen gießen
- Aufbewahrung im Kühlschrank und vor Licht geschützt

### Zusammensetzung:

Hefeextrakt 0,5 g/l

Proteose-Pepton 0,5 g/l

Caseinhydrolysat 0,5 g/l

Glucose 0,5 g/l

Stärke 0,5 g/l

Natriumpyruvat 0,3 g/l

Di-Kaliumhydrogenphosphat 0,3 g/l

Magnesiumsulfat 0,05 g/l

Agar-Agar 12,0 g/l

### **Endo-Agar:**

- 51 g/l pulverförmiges Fertignährmedium (Difco, 0736.17) mit 20 ml 96%iges Ethanol verrühren und in VE-Wasser lösen
- 1 h bei 98°C im Dampftopf sterilisieren
- temperieren auf 50°C
- unter der Sterilbank in sterile Petrischalen gießen
- Aufbewahrung im Kühlschrank und vor Licht geschützt

### Zusammensetzung:

Hefeextrakt 1,2 g/l

Pepton aus Casen 3,7 g/l

Natriumchlorid 3,7 g/l

Laktose 9,4 g/l

Fuchsin 0,8 g/l

Natriumsulfit 1,6 g/l

Thiopepton 3,7 g/l

Tryptose 7,5 g/l

Agar-Agar 12,0 g/l

Ethanol 96%ig 20 ml/l

Platten giessen:

- Nährmedien kochen (s.o.)
- Agar auf 50 °C im Wasserbad abkühlen
- Antibiotikastammlösung zugeben (je nach gebrauchter Konzentration)
- Schütteln
- Platten gießen

Durchführung:

Die Proben wurden je nach Aggregatzustand unterschiedlich für die Bestimmung der KBE-Zahl vorbereitet. Die flüssigen Proben wurden mit einem sterilen Drigalskispatel auf Nähragarplatten ausgespatelt. Die festen Proben wurden zur Aufarbeitung nach DIN 38414-4 in entmineralisiertem Wasser eluiert, bevor sie nach Abtrennung von der festen Phase auf den Nährmedien ausgespatelt wurden.

Die Bestimmung der KBE-Zahl wurde auf 3 verschiedenen Nährmedien durchgeführt: DEV-Agar, R2A-Agar und Endo-Agar. Die Herstellung der Nährmedien und das Giessen der Platten sind oben aufgeführt. Die Nährmedien wurden nach dem Beimpfen bei 20°C bzw. bei 36°C (Endo-Agar) bebrütet und nach 1 Tag (Endo-Agar), nach 2 Tagen (DEV-Agar), 5 Tagen (R2A-Agar) ausgezählt.

Das DEV-Nährmedium ist ein Universalmedium mit einer hochwertigen Nährstoffgrundlage. Es wird hauptsächlich zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl nach der deutschen Trinkwasserverordnung eingesetzt. Das R2A-Nährmedium gilt als Universalmedium mit geringem Nährstoffangebot. Es dient zur Erfassung von langsamwachsenden, heterotrophen Bakterien für mikrobiologische Wasseruntersuchungen. Der Endo-Agar ist ein Selektivmedium zur Isolierung von Coliformen und E.coli. Durch die Inhaltsstoffe des Agar können die beiden Bakterien durch ihre Färbung (Coliforme: rot, E.coli: grün) unterschieden werden.

Zur Bestimmung der resistenten Bakterien wurden Nährmedien in parallelen Ansätzen mit Antibiotikum (Chlortetracyclin, iso-Chlortetracyclin bzw. Sulfadiazin) versetzt. Das Antibiotikum wurde dem noch flüssigen Nähragar vor dem Giessen der Platten in einer solchen Menge zugesetzt, dass im Nährmedium eine Konzentration des Antibiotikum von 10 mg/l vorhanden ist. Diese Konzentration sollte das Wachstum nicht resistenter Bakterien hemmen. 200 ml Nährmedium wurden 2 ml einer Antibiotikastammlösung zugesetzt, die eine Konzentration von 1 mg/ml hat.

### 3.3 Bestimmung der Esterase-Aktivität

Die Esterase-Aktivität ist ein Summenparameter für die mikrobiologische Aktivität in Umweltproben. Die Methode wurde nach dem Verfahren von Obst und Holzapfel-Pschorn durchgeführt, bei dem die Umsetzung des Substrates Fluoresceindiacetat (FDA) zu Fluorescein nach einer festgelegten Zeit im definierten Volumen fluoreszenzspektrometrisch gemessen wird [Obst et al. 1988]. Dabei werden die extrazellulären Esterase-Aktivitäten aller Mikroorganismen erfasst, also von Bakterien, Pilzen und Protozoen.

Geräte:

Fluorimeter:

Fluorimeter LS 50 B Luminescence Spectrometer / Bj. '92, Perkin Elmer, Seriennummer 33915



Abb. 3.3.1: Fluorimeter

Brutschrank:

Brutschrank, Binder, Seriennr. 05-77620

Chemikalien:

- Fluoresceindiacetat (Sigma F-7378)
- Fluorescein-Na (Sigma F-6377)
- Aceton
- HEPES-Na / 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure (Merck 15231)
- NaCl (Merck 1.06404)

## Lösungen:

### Fluoresceindiacetatlösung:

20 mg Fluoresceindiacetat (Sigma F-7378) mit 10 ml Aceton in einem sterilen Gefäß lösen und dicht verschließen.

Lösung im Gefrierfach aufbewahren!

### Fluorescein-Standard-Stammlösung:

10 mg Fluorescein-Na (Sigma F-6377) mit 100 ml sterilem bidest. in einem sterilen Gefäß lösen.

Lösung im Kühlschrank aufbewahren!

### Fluorescein-Standard-Testlösung:

1 ml Fluorescein-Stand.-Stammlsg (s.o.) mit sterilem bidest. in einem sterilen Gefäß auf 100 ml auffüllen (Konz. 0,1 µg/ml).

Lösung im Kühlschrank aufbewahren!

### 0,1 M HEPES-Puffer:

- 2,38 g HEPES-Na / 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure (Merck 15231) in ca. 80 ml bidest. lösen
- pH-Wert mittels NaOH bzw. HCl auf 7,5 einstellen
- mit bidest. auf 100 ml auffüllen
- autoklavieren.

Lösung im Kühlschrank aufbewahren!

## Durchführung:

Die Bodenproben wurden in ein steriles Einwegröhrchen eingewogen (3 g) und mit 6 ml sterilem Trinkwasser versetzt. 1 ml HEPES-Puffer und 60 µl FDA-Lsg. wurden hinzugegeben, geschüttelt und 60 min bei 20°C im Brutschrank inkubiert. Die Schwebstoffe wurden bei 6000 rpm 15 min lang abzentrifugiert. Nach 10 min nimmt man 3 ml vom Überstand für die Messung im Fluorimeter ab. Flüssige Proben wurden direkt in Einwegröhrchen überführt (3 ml) und mit 0,5 ml HEPES-Puffer und 20 µl FDA-Lsg. versetzt und geschüttelt. Nach 90 min Inkubationszeit im Brutschrank bei 20°C werden 3 ml für die Messung im Fluorimeter eingesetzt. Im Fluorimeter wird das durch den Umsatz der FDA-Lsg. freigesetzte Fluorescein gemessen. Die Menge des so gebildeten Fluorescein ist ein Maß für die Anzahl und Aktivität von Mikroorganismen.

Die Berechnung der Esterase-Aktivität als Substratumsatz pro Zeit und Volumeneinheit erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{FDA-Umsatz (ng/ml/h)} = X/1,5 \text{ h} * F$$

mit  $F = 2$  (aus 1 Mol FDA werden 2 Mol Acetat abgespalten)

$$X = (\text{INT}_{\text{Probe}} - \text{INT}_{\text{Probenblindwert}}) * \text{Konzentration}_{\text{Kalibrierstandard}} \text{ ng/ml} / \text{INT}_{\text{Kalibrierstandard}}$$

### 3.4 MHK-Bestimmung zum Nachweis resistenter Mikroorganismen

Die MHK-Bestimmung nach der Agar-Dilutionsmethode wurde nach DIN 58940-6 durchgeführt. Die Proben wurden auf DEV-Agar ausgespatelt und die angezüchteten Mikroorganismen in der MHK-Bestimmung eingesetzt. Hierbei wurden DEV-Agarplatten als Nährmedium gegossen, denen das entsprechende Antibiotikum in definierter Konzentration zugesetzt wurde. Es wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich der Bewertungsgrenzen eingesetzt. Für Tetracycline gilt nach DIN 58940-4 Bbl 1 ein Bakterienstamm mit einem MHK von weniger als 1 mg/l als „sensibel“, ein Stamm mit einem MHK von 1-4 mg/l als „intermediär“ und ein Stamm mit einem MHK von mehr als 4 mg/l als „resistent“. Für die Bestimmung der MHK für CTC wurden Nährmedien mit Antibiotikakonzentrationen von 1, 2, 4, 8, 16 und 32 mg/l hergestellt.

Für SFD gibt es in der DIN 58940-4 Bbl 1 und DIN 58940-6 keine solchen Bewertungskriterien. Es wurden daher Nährmedien mit den gleichen Antibiotikakonzentrationen wie bei CTC und zusätzlich noch mit 64 mg/l hergestellt.

Geräte:

Autoklav:

Nährmedienautoklav Varioklav Typ 500 Tisch, Bj. 1997, H + P Labortechnik, Seriennr. 59351296

Sterilbank:

Prettl-Sicherheitswerkbank Typ MRF 1600, Goller Reinraumtechnik

Brutschrank:

Brutschrank, Binder, Seriennr. 05-77620

## Chemikalien:

- DEV-Agar-Fertigpulver (Merck, 1.11471.5000)
- R2A-Agar-Fertignährmedium (Merck, 1.00416.0500)
- Endo-Agar-Fertignährmedium (Difco, 0736.17)
- VE-Wasser
- Chlortetracyclin (Riedel-de Haen, 46133)
- Sulfonamid (Riedel-de Haen, 35033)

## Antibiotikastammlösungen:

- 32 mg des CTC und 64 mg des SFD in 100 ml-Messkolben einwiegen und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen (Konzentration: 320 bzw. 640 mg/l)
- ggf. nicht gelöstes Antibiotikum im Ultraschallbad lösen
- Lösung im Kühlschrank dunkel lagern

Lösung vor Gebrauch gut schütteln und steril filtrieren!

## Platten giessen (Nährmedien kochen s.o.):

- Agar auf 50 °C im Wasserbad abkühlen
- Antibiotikastammlösung zugeben (je nach benötigter Konzentration)
- Schütteln
- Platten gießen

## Durchführung:

Die Proben wurden je nach Aggregatzustand unterschiedlich für die MHK-Bestimmung vorbereitet. Die flüssigen Proben wurden mit einem sterilen Drigalskispatel auf DEV-Nähragarplatten ausgespatelt. Die festen Proben wurden zur Aufarbeitung nach DIN 38414-4 in entmineralisiertem Wasser eluiert, bevor sie nach Abtrennung von der festen Phase auf den DEV-Nähragarplatten ausgespatelt wurden.

Von den auf DEV-Nähragarplatten isolierten Bakterienstämmen wurden drei bis fünf Einzelkolonien abgenommen und in 10 ml Ringerlösung suspendiert. Nach 2 Stunden Inkubationszeit wurden von dieser Bakterienlösung je 5µl auf die Agarplatten aufgetropft (pro Agarplatte 3 Proben und 1 Kontrollstamm). Als antibiotikasensible Kontrollstämme wurden auf jeder Agarplatte entweder *Enterococcus faecalis* (DSM 2570) oder *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1117) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit von 48 h bei 20°C im Brutschrank wurden die Kolonien auf ihr Wachstum überprüft. Die geringste Konzentration des Antibiotikums, bei der kein koloniebildendes Wachstum an der Auftragsstelle zu sehen war, wird als minimale Hemmkonzentration (MHK) der Probe bezeichnet. Laut DIN-Norm sind „kaum sichtbares Minimalwachstum“ sowie „wenige nadelspitzenartige Einzelkolonien“ zu vernachlässigen [DIN 58940-4] (Abb. 3.4.1).

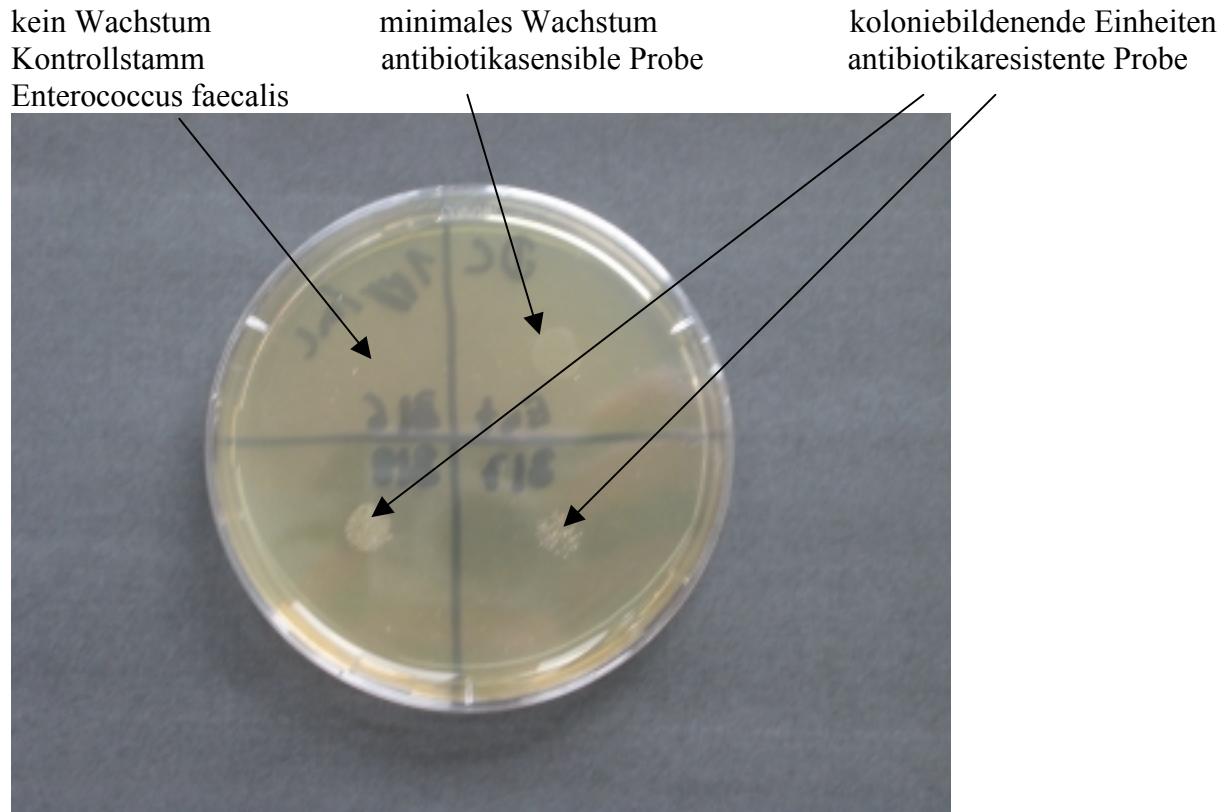


Abb. 3.4.1: Beispiel eines Ergebnisses einer MHK-Bestimmung

### 3.5 Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR

Die PCR ist eine enzymatische Reaktion zur Vermehrung (Amplifikation) eines bestimmten DNA-Abschnittes. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird von zwei Oligonukleotiden, den Primern, begrenzt, die als Anfangs- bzw. Endpunkt der zu vermehrenden Sequenz dienen. Die Primer sind so orientiert, dass sie die gegenüberliegenden Stränge des DNA-Doppelstranges begrenzen, so dass die eingesetzte Polymerase den komplementären Strang zur Vorlage (Template) des Einzelstranges aufbaut. Jeder neue Strang kann so auch als Template dienen, so dass nur der von den Primern begrenzte DNA-Abschnitt vermehrt wird. Dieser wird durch die Temperaturführung der PCR mit ständiger Wiederholung der Denaturierung, Primerannealing (Anlagerung der Primer) und DNA-Extension (Polymerisation) exponentiell vermehrt (Abb. 3.4.1). Die Enden des amplifizierten DNA-Stranges entsprechen exakt den Primern.

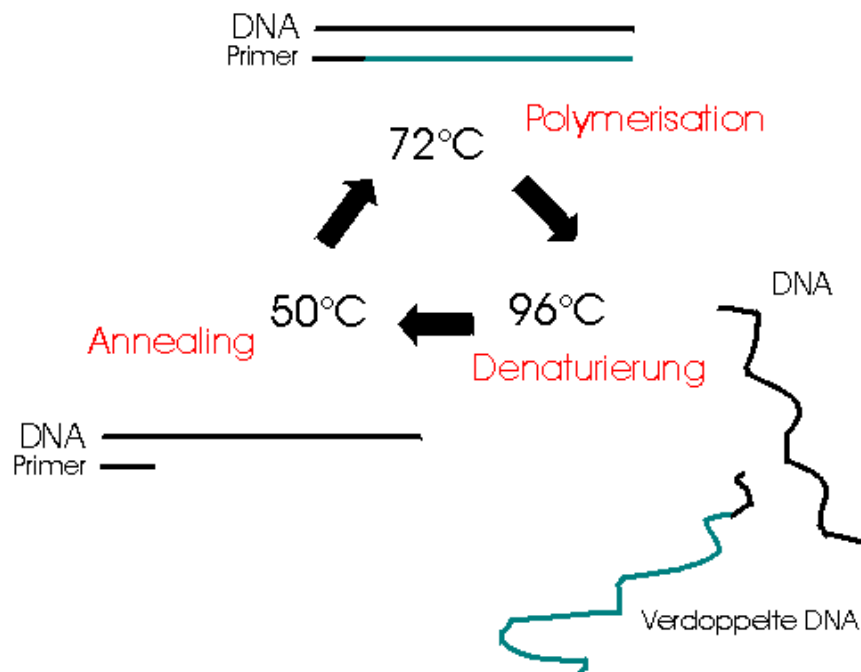


Abb. 3.5.1: Schematischer Verlauf eines PCR-Zyklus

Geräte:

PCR:

Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 / Bj. '96, Perkin Elmer, Seriennr. N-03417



Abb. 3.5.2: Thermocycler für die PCR

Gelelektrophorese:

Elektrophoresekammer Typ Agagel G45, Biometra, Seriennr. 6457346

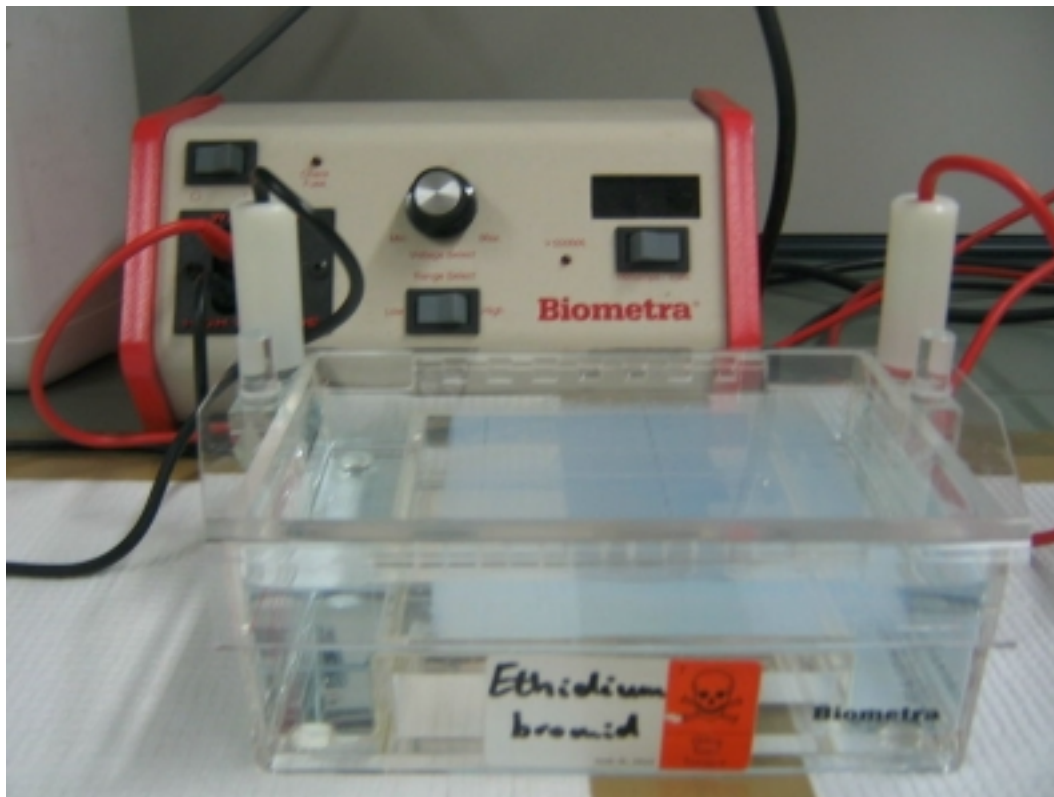


Abb. 3.5.3: Elektrophoresekammer für Gelelektrophorese

Brutschrank:

Brutschrank, Binder, Seriennr. 05-77620

Sterilbank:

Prettl-Sicherheitswerkbank Typ MRF 1600, Goller Reinraumtechnik

Wasserbäder:

Schüttelwasserbad Typ 1083 / Bj. '97, GFL, Seriennr. 11333797 J

Wasserbad Typ 1008, GFL, Seriennr. 10406088 C

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Biofuge Pico / Bj. '97, Heraeus, Seriennr. 258119

Tischzentrifuge 1.0R / Bj. '05, Kendro, Fabr.-Nr. 40483465

Autoklav:

Nährmedienautoklav Varioklav Typ 500 Tisch, Bj. 1997, H + P Labortechnik,  
Seriennr. 59351296

UV-Tisch:

Transluminator Tl 1, Biometra, Seriennr. 9411005

## Chemikalien:

- Agarose (amresco, 0710-100G)
- Dye Solution (Promega)
- Ethanol, 100% (Merck, 1.00986.2500)
- Ethanol 70%
- Ethidiumbromid (amresco X328-10ML) (Biometra 10mg/l)
- Lysozym (ICN, 100834)
- Natriumdodecylsulfat (ICN, 811036)
- Proteinase K, Lösung (Merck, 1.07393.0010)
- PVPP = Polyvinylpolypyrrolidon (Sigma, P-6755)
- Ribonuclease A, Lösung in Glycerol (Sigma, R-4642)
- Sodium Acetat Buffer Solution, 3M (Sigma, S-7899)
- Titriplex III = EDTA (Merck, 1.08418.0250)
- Tris-Base = Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, 1.01549.0500)
- Tris-HCl (Fluka, 93363)
- NaCl (Merck 1.06404)
- AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, N808-0160)
- 10x PCR-Buffer (Applied Biosystems, N808-0160)
- DNA E.coli (Sigma, D-0421)
- GeneAmp dNTPs (Applied Biosystems, N808-0007)
- Lambda DNA/EcoR1 + Hind III (Sigma, D-9281)
- Primer (Ribo-2, Biometra, # 40429/40430)
- Primer (Tet H, Biometra, # 40332/40333)
- Primer (Tet L, Biometra, # 40197/40198)
- Primer (Tet M, Biometra, # 40199/40200)
- Primer (Tet O, Biometra, # 40334/40335)
- Primer (Tet Q, Biometra, # 40201/40202)
- Primer (Tet W, Biometra, # 40336/40337)
- Primer (Sul 1, Biometra, # 40475/40476)
- Primer (Sul 2, Biometra, # 40477/40478)
- Primer (Sul 3, Biometra, # 40479/40480)
- Ribonuclease A, Lösung in Glycerol (Sigma R-4642)
- QIAamp DNA Blood Kit 50 (Qiagen, 51104)

## Lösungen:

### PCR-Aufarbeitung

TE-Puffer (100 ml):

- 0,1576 g Tris-HCl (Fluka 93363) und  
0,0372 g Titriplex III (EDTA - Merck 1.08418) einwiegen
- in bidest. (< 100 ml) lösen
- pH auf 7,5 einstellen und auf 100 ml mit bidest. auffüllen
- autoklavieren

Extraktionspuffer (1 Liter):

- 7,88 g Tris-HCl (Fluka 93363) 50 mM,  
0,73 g Titriplex III (EDTA - Merck 1.08418) 1 mM und

- 5,8 g NaCl (Merck 1.06404) 100 mM einwiegen
- in <1 Liter bidest. lösen
- pH auf 8,0 einstellen und auf 1 Liter mit bidest. auffüllen
- autoklavieren

Lysozym-Lösung (10 ml):

- 150 mg Lysozym (ICN 100834) unter sterilen Bedingungen in einem kleinen Gefäß einwiegen
- in 10 ml Extraktionspuffer 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Titriplex III), 100 mM NaCl lösen

10% SDS Lösung (10 ml):

- 1 g Natriumdodecylsulfat (ICN 811036) unter sterilen Bedingungen in einem kleinen Gefäß einwiegen
- in 10 ml Extraktionspuffer 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Titriplex III), 100 mM NaCl lösen

## **PCR**

Primer 1:10 (100 µl):

- unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) arbeiten
- 90 µl steriles bidest. in steriles Reaktionsgefäß füllen
- 10 µl Primer dazugeben

dNTP-Mix (200 µl):

- unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) arbeiten
- 100 µl steriles bidest. in steriles Reaktionsgefäß füllen
- 25 µl dATP,
- 25 µl dCTP,
- 25 µl dGTP und
- 25 µl dTTP (GeneAmps dNTPs, Perkin Elmer N808-0007) dazugeben

## **Gelelektrophorese**

50x TAE-Buffer (1 Liter):

Erstellen einer 0,5 M EDTA-Lösung:

- 18,612 g Titriplex III (Merck 1.08418) einwiegen
- in <100 ml bidest. lösen
- pH auf 8,0 einstellen und auf 100 ml auffüllen
- autoklavieren
  
- 242,0 g Tris-Base (Merck 1.01549) einwiegen
- 57,1 ml Essigsäure (Merck 1.00063) dazugeben
- 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung (s.o.) dazugeben
- auf <1 Liter mit bidest. Auffüllen
- pH auf 8,5 einstellen und auf 1 Liter mit bidest. auffüllen
- ggf. autoklavieren

### **3.5.1. Durchführung der Probenaufarbeitung**

Die Probenaufarbeitung wurde nach einem Verfahren durchgeführt, das am IfW entwickelt worden ist [Kilb et al. 1998].

#### **Lyse der Bakterienzellen**

Bei flüssigem Probenmaterial (Wasserproben), wurde die Probe durch einen sterilen 0,22 µm-Filter filtriert. Der Filter wurde auf einem sterilen Uhrglas mit einem Skalpell zerkleinert und die Stücke in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Bei einer festen Probe (Bodenprobe) wurde mit einem sterilen Spatel in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Kolonien von Agarplatten (Bakterienstämme) wurden mit einer Impföse vom Nährmedium abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Den Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zuerst 480 µl Lysozym zugegeben und 2h bei 37°C inkubiert, dann wurde 120 µl Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben und noch mal 30 min bei 37°C inkubiert. Um sicher zu gehen, dass alle Zellen aufgebrochen worden sind, wurde die Probe noch durch fünfmaliges Einfrieren (Trockeneis) und Auftauen lysiert.

#### **DNA-Extraktion mit Qiagen-Kit (QIAamp DNA Blood Kit 50)**

3µl RNase wurden zur Probe gegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von Proteinkinase (1/10 des Probenvolumens) und einer Pufferlösung (Volumen wie Probemenge) wurde für 10 min bei 56°C inkubiert. Es wurde 100%iges Ethanol zugegeben und die Probe wurde in 635 µl Portionen auf eine Säule aufgetragen und je 1 min (8000 rpm, 20°C) zentrifugiert, bis die Probe verbraucht war. Die DNA befand sich dann auf der Säule. Es wurde mehrmals mit Pufferlösungen nachgespült und die Flüssigkeit durch Zentrifugation durch die Säule gedrückt. Mit einer anderen Pufferlösung wurde dann die DNA von der Säule abgelöst (eluiert) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 20 µl Natriumacetat und 440 µl 100%igem Ethanol trat die Ethanolfällung über Nacht im Gefrierfach ein. Durch die Zentrifugation mit 15000 rpm bei 4°C für 45 min hatte sich die DNA am Rand des 1,5 ml Reaktionsgefäßes abgesetzt. Das Ethanol wurden abpipettiert. Nach Zugabe von 600 µl 70%igen Ethanol wurde erneut für 15 min zentrifugiert und das Ethanol wieder abpipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde zum Trocknen offen stehen gelassen und nach der Zugabe von TE-Puffer

wurde das DNA-Pellet durch Schnippen vom Rand gelöst. Die Probe wurde bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert.

### **3.5.2. Durchführung der DNA-Amplifikation (PCR)**

Der 100 µl PCR-Ansatz setzt sich aus 89,5 µl Mastermix (der Master Mix besteht aus 10 µl 10fach PCR-Puffer, 10 µl BSA-Lsg., 16 µl dNTP-Mix, jeweils 5 µl Primer FW und Primer RV (1:10 verdünnt) und 43,5 µl sterilem Wasser), 10 µl Probe (wenn weniger eingesetzt wird, wird mit TE-Puffer auf 10µl aufgefüllt) und 0,5 µl Polymerase zusammen.

Die Auswahl der Resistenzgene gegen Chlortetracyclin, die überprüft werden sollten, aus dem Pool der über 30 heute bekannten Resistenzgene erfolgte nach eingehender Literaturrecherche. Die Kriterien zur Auswahl waren Vorkommen in der Umwelt, Sequenz der PCR-Primer und Ergebnisse anderer Studien in bezug auf Wiederfindung und Verbreitung der Resistenzgene. Für die Tetracyclinresistenz wurden 6 Gene ausgewählt: die Primerpaare für Tet H und Tet L (Efflux-Resistenzgene), sowie für die RPP-Resistenzgene Tet M, Tet O, Tet Q und Tet W wurden eingesetzt. Des weiteren wurde auch ein degeneriertes Primerpaar, Ribo-2 eingesetzt, das ein Amplicon der RPP-Resistenzgene Tet M, O, P, Q, S, T, und W (Tab.3.5.2.1) amplifiziert.

Tab. 3.5.2.1: Primerpaare für verschiedene Tetracyclin-Resistenzgene [Aminov et al. 2000, Aminov et al. 2002, Aarestrup et al. 2002, Yu et al. 2005, Agerso et al. 2005]

TetR-Gen	Mechanismus	Sequenz der Primer (5'-3')	annealing(°C)	Amplicon(bp)
Tet H	Efflux	FW: CAGTGAAAATTCACTGGCAAC RV: ATCCAAAGTGTGGTTGAGAAT	61	185
Tet L	Efflux	FW: CATTGGTCTTATTGGATCG RV: ATTACACTTCCGATTTCCGG	50	488
Tet M	RPP	FW: ACAGAAAGCTTATTATATAAC RV: TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	55	171
Tet O	RPP	FW: ACGGARAGTTTATTGTATAACC RV: TGGCGTATCTATAATGTTGAC	60	171
Tet Q	RPP	FW: AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG RV: CGGAGTGTCAATGATATTGCA	63	169
Tet W	RPP	FW: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC RV: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	64	168
Tet M, O, P, Q, S, T, W	RPP	FW: GGMCAYRTGGATTTYWTIGC RV: TCIGMIGGIGTRCTIRCIGGRC	52	1315

Für die Sulfonamid-Resistenz wurden die Primerpaare für die drei in der Literatur beschriebenen Resistenzgene Sul 1, Sul 2 und Sul 3 eingesetzt (Tab. 3.5.2.2) [Boerlin et al. 2005].

Tab. 3.5.2.2: Primerpaare der Sulfonamid-Resistenzgene [Boerlin 2005 et al.]

SulR-Gen	Sequenz der Primer (5'-3')	annealing (°C)	amplicon (bp)
Sul 1	FW: GTGACGGTGTTCGGCATTCT RV: TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	68	779
Sul 2	FW: CGGCATCGTCAACATAACCT RV: TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	66	721
Sul 3	FW: GAGCAAGATTTTGGAAATCG RV: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	51	880

Für jedes einzelne Primerpaar wurde ein Temperaturprogramm mit der entsprechenden annealing Temperatur erstellt. Die annealing-Temperaturen sind zusammen mit der Sequenz der Primer und der Größe des Amplicons in den Tabellen 3.5.2.1 und 3.5.2.2 aufgelistet. Die Temperaturprogramme wurden aus der Literatur übernommen und in manchen Fällen leicht modifiziert. Grundsätzlich wurden die Temperaturprogramme bis auf die annealing Temperatur immer gleich aufgebaut. Sie laufen nach folgendem Schema ab:

- Denaturierung der DNA bei 94°C für 4 min
- 30 Zyklen der Anreicherung des entsprechenden Amplicons mit:
  - Denaturierung bei 94°C für 30 sec
  - Primer-annealing bei entsprechender Temperatur für 30 sec (siehe Tab. 3.5.2.1 und 3.5.2.2)
  - Extension bei 72°C für 30 sec
- Extension bei 72°C für 7 min

Die PCR mit dem degenerierten Primerpaar Ribo-2 wurde mit einer etwas modifizierten Temperaturführung durchgeführt, der sogenannten touchdown PCR [Yu et al. 2005]. Nach der ersten Denaturierung bei 94°C für 4 min folgten zuerst 5 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 sec, annealing bei 56°C (bei jedem Zyklus 1°C weniger, daher touchdown) für 90 sec und abschließender Extension bei 72°C für 60 sec. Daran schlossen sich 40 Zyklen der normalen Anreicherung des Amplicons an: Denaturierung bei 94°C für 30 sec, annealing bei 52°C für 90 sec, Extension bei 72°C für 30 sec. Zum Schluss gab es noch die abschließende Extension bei 72°C für 7 min. Die einzelnen Temperaturprogramme sind in Anhang D dokumentiert. Nach der PCR wurden die Produkte zur Analyse auf ein Agarosegel gebracht.

Zur Gelelektrophorese wurde ein 1,2%iges Agarosegel, das mit 5 µl Ethidiumbromid zum Anfärben von doppelsträngiger DNA versetzt wird, eingesetzt. Die Taschen des Gels wurden mit den Proben (10 µl und 4 µl Färbelösung (Dye)) und einem Größenmarker (Lambda DNA EcoR I Hind III Digest von Sigma) beladen und 30 min eine Spannung von 72-76 V angelegt. Zur Auswertung wurde das Gel mit UV-Licht angestrahlt und ein Foto gemacht.

## **3.6 Untersuchte Proben und Bakterienisolate**

### **3.6.1 Proben und Bakterienisolate aus dem Säulenversuch**

Der Transport der Antibiotika CTC und SFD wurde in einem Säulenversuch untersucht (siehe Kapitel 1.2) [Büchner 2006]. Begleitend wurden die in Kapitel 3.2 und 3.3 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der KBE-Zahl und der Esterase-Aktivität für die mikrobiologischen Untersuchungen eingesetzt. Im Säulenversuch wurde in einer 1 m hohen Glassäule mit einem

Durchmesser von 45 cm ein Ackerboden mit verschiedenen Bodenschichten, mit Gülle, der CTC und SFD zugesetzt worden ist, beaufschlagt und dann definierte Regenereignisse simuliert (Abb. 3.6.1.1). Die Gülle und der Boden sind sowohl vor als auch nach dem Versuch und Sickerwasserproben der vier Starkregenereignisse während des Versuches mikrobiologisch untersucht worden. Um den Anteil der resistenten Bakterien zu bestimmen, sind Agarplatten bei der KBE-Zahl-Bestimmung mit Antibiotika versetzt und die KBE-Zahl mit antibiotikafreien Agarplatten in Bezug gesetzt worden. Zur Bestimmung der Resistenzgene in den verschiedenen Kompartimenten ist die PCR mit spezifischen Primerpaaren angewendet worden.

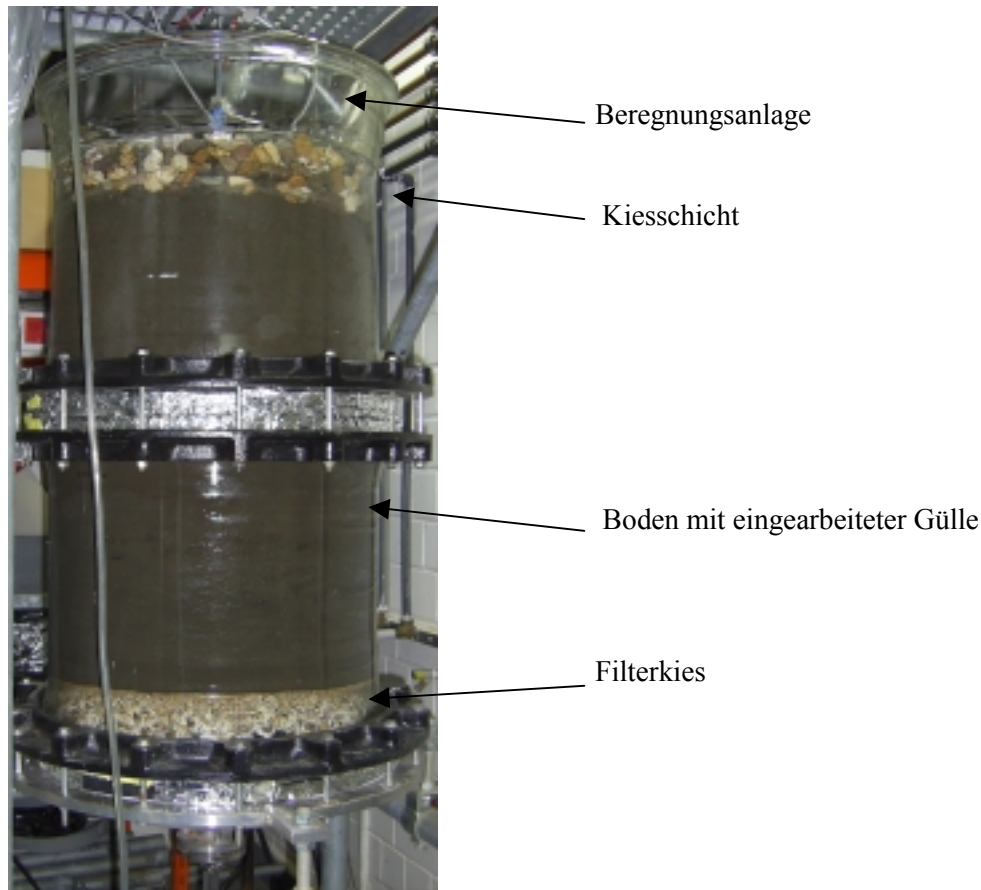


Abb. 3.6.1.1: Versuchssäule [Büchner 2006]

Die Gülle, die im Säulenversuch eingesetzt worden ist, wurde vom Schweinmastbetrieb Haus Düsse erhalten. Hier wurden die Ausscheidungen von Mastschweinen in einem Tank gesammelt. Die Probe ist über einen Zeitraum von weiteren 6 Monaten im Kühlschrank bei ca. 8°C gelagert worden. In einer Analyse am IfW konnten kein CTC und kein SFD in der Gülle nachgewiesen werden. Der Gülle wurde daher vor dem Versuch CTC und SFD in Mengen zugegeben, die realen Bedingungen auf mit Gülle gedüngten Äckern entsprechen. Der Boden, der in die Säule eingebaut worden ist, wurde von einem über Jahre brach liegendem Acker genommen. Der eingesetzte Boden ist vor und nach dem Säulenversuch beprobt worden. Während der

verschiedenen Beregnungen wurden nur die vier Starkregenereignisse beprobt, da nur bei diesen Ereignissen genug Sickerwasser gewonnen werden konnte.

Tab. 3.6.1.1: Proben und Bakterienisolate aus dem Säulenversuch

Bezeichnung	Probenart	Probenahmestelle	Datum	Bemerkungen
Gülle (Düse)	Gülle	Gülle pur (Düse)	22.12.2005	
Iso-Gül	Isolat	Isolat v. Gülle (Düse)	22.12.2005	DEV
Entero	Isolat	Isolat v. Gülle (Düse)	22.12.2005	Enterokokkenselektivagar
Coli	Isolat	Isolat v. Gülle (Düse)	22.12.2005	Endoagar
BO vor	Boden	Boden vorher	22.12.2005	
SR1	Sickerwasser	SR1	09.01.2006	eingewogen
SR2	Sickerwasser	SR2	23.01.2006	zentrifugiert
SR2a	Isolat	SR2	23.01.2006	DEV
SR2b	Isolat	SR2	23.01.2006	DEV
SR2c	Isolat	SR2	23.01.2006	DEV
BO 0-5	Boden	nachher T 0-5 cm	06.03.2006	
BO 5-10	Boden	nachher T 5-10 cm	06.03.2006	
BO 10-20	Boden	nachher T 10-20 cm	06.03.2006	
BO 20-30	Boden	nachher T 20-30 cm	06.03.2006	
BO 40-50	Boden	nachher T 40-50 cm	06.03.2006	

### 3.6.2 Proben und Bakterienisolate aus dem Freilandversuch

Zudem wurden Proben aus einem Projekt der Uni Paderborn mikrobiologisch untersucht. Bei diesem Projekt wurde ein jahrelang brach liegender Acker als Versuchsacker genutzt. Auf dem Acker wurden verschiedene Kulturpflanzen ausgesät und der Acker wurde mit Gülle von mit CTC und SFD medikamentierten Schweinen beaufschlagt [Grote et al. 2006]. Außer den Bodenproben wurden auch Gülleproben, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Medikation entnommen wurden, untersucht. Die Bodenproben wurden als Mischproben aus einer Tiefe von 0-25 cm entnommen. Die Bodenproben sind bis zur Weiterverwendung bei 8°C im Kühlschrank gelagert worden. Zur Aufarbeitung wurden die Bodenproben nach DIN 38414 S 4 in entmineralisiertem Wasser eluiert. Nach dem Absetzen der Schwebstoffe wird 1 ml des Eluats auf DEV-Agar ausgespatelt. Die auf antibiotikafreiem DEV-Agar kultivierten Mikroorganismen wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Tab. 3.6.2.1: Proben und Bakterienisolate aus dem Freilandversuch

Bezeichnung	Probenart	Probenahmestelle	Datum	Bemerkungen
GG	Gülle	Gülle Paderborn	30.08.2001	Sammelprobe II 1. Med.
GG I	Isolat d. Gülle	Gülle Paderborn	30.08.2001	DEV
G 4 G	Gülle	Gülle Paderborn	31.10.2001	Sammelprobe IV 1. Med.
G 5 G	Gülle	Gülle Paderborn	29.11.2001	Sammelprobe V 1. Med.
BO 1 G	Boden	Feld 2 (0-25 cm)	12.03.2002	0-Probe
BO 2 G	Boden	Feld 2 (0-25 cm)	19.03.2002	1. Güllegabe
BO 3 G	Boden	Feld 2 (0-25 cm)	15.04.2002	
BO 4 G	Boden	Feld 2 (0-25 cm)	22.04.2002	2. Güllegabe
BO 5 G	Boden	Feld 2 (0-25 cm)	15.05.2002	
BO 6 G	Boden	Feld 2 (0-25 cm)	17.07.2002	
BO 7 G	Boden	Feld 2 (0-25 cm)	20.08.2002	

### 3.6.3 Bakterienisolate aus Batchversuchen

Innerhalb einer Bachelorarbeit wurden 2005 am IfW Batchversuche in Anlehnung an den OECD M-Test durchgeführt [Kutzera 2005]. Bei diesen Versuchen wurden die Auswirkungen von SFD und CTC auf die mikrobielle Besiedlung von Umweltproben und deren Abbau untersucht. Hierbei wurden Nährmedien mit Umweltproben (Wasser, Boden) und den Testsubstanzen versetzt und die Konzentrationen der Testsubstanzen in regelmäßigen Abständen bestimmt. Gleichzeitig wurden Kulturen vereinzelter in den Ansätzen vorhandenen Mikroorganismen angelegt und die Resistenz der Bakterienisolate gegen CTC und SFD untersucht.

Tab. 3.6.3.1: Liste der Bakterienisolate aus Batchversuchen

Bezeichnung	Probenart	Probenahmestelle	Datum	Bemerkungen
BI 1 MM	Isolat	Grundwasser, Nr. 9	09.02.2006	wächst mit CTC
BI 2 MM	Isolat	Boden, Nr. 88	09.02.2006	wächst mit SFD
BI 3 MM	Isolat	Grundwasser, Nr. 20	09.02.2006	wächst mit SFD
BI 4 MM	Isolat	Oberflächenw., Nr. 55	09.02.2006	wächst mit SFD
BI 5 MM	Isolat	Oberflächenw., Nr. 44	09.02.2006	wächst mit CTC
BI 6 MM	Isolat	Boden, Nr. 77	09.02.2006	wächst mit CTC
BI 7 MM	Isolat	Boden, Nr. 77	09.02.2006	wächst mit CTC
BI 8 MM	Isolat	Boden, Nr. 77	09.02.2006	wächst mit CTC
BI 10 MM	Isolat	Boden, Nr. 88	09.02.2006	wächst mit SFD
BI 11 MM	Isolat	Oberflächenw., Nr. 55	09.02.2006	wächst mit SFD
BI 13 MM	Isolat	Grundwasser, Nr. 20	09.02.2006	wächst mit SFD
BI 19 MM	Isolat	Grundwasser, Nr. 20	09.02.2006	wächst mit CTC

### 3.6.4 Bakterienisolate von Umweltproben

In eigener Probennahme wurden Bodenproben von verschiedenen landwirtschaftlich genutzten Äckern im Raum Dorsten genommen. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben nach DIN 38414 S 4. Im Raum Dorsten wurden auch zwei Grundwasserproben genommen. Sie wurden einen Tag im Kühlschrank bei 8°C gelagert und dann auf DEV-Agar ausgespatelt. Eine Oberflächenwasserprobe wurde im Raum Schwerte aus der Ruhr und zwei weitere aus Zuflüssen der Ruhr genommen. Zwei Oberflächenwasserproben wurden aus zwei kleinen Bächen im Raum Dorsten, die in direkter Nähe zu landwirtschaftlich genutzten Flächen liegen, genommen. Auch die Oberflächenwasserproben wurden einen Tag im Kühlschrank gelagert und dann auf DEV-Agar ausgespatelt. Zur weiteren Analyse wurden die Bakterienisolate aus den Proben verwendet.

Tab. 3.6.4.1: Bakterienisolate von Umweltproben

Bezeichnung	Probenart	Probenahmestelle	Datum	Bemerkungen
OW 1	Isolat	Ruhr, Hengsen	27.04.2006	Oberflächenw., klar
OW 2	Isolat	Gehrenbach, Schwerte	27.04.2006	Oberflächenw., trüb
OW 3	Isolat	Baarbach unterhalb KLA	27.04.2006	Oberflächenw., trüb
OW 4	Isolat	Schölzbach Dorsten	13.05.2006	Oberflächenw., trüb
OW 5	Isolat	Erdbach Altendorf	14.05.2006	Oberflächenw., klar
GW 1	Isolat	Brunnen 1 Dorsten	13.05.2006	Grundwasser, trüb
GW 2	Isolat	Brunnen 2 Dorsten	14.05.2006	Grundwasser, klar
BO1	Isolat	Acker Polsumer Weg	12.05.2006	Boden, bepflanzt
BO2	Isolat	Acker Rotes Venn	12.05.2006	Boden, unbepflanzt
BO3	Isolat	Acker Tönsholt A	12.05.2006	Boden, unbepflanzt
BO4	Isolat	Acker Tönsholt B	12.05.2006	Boden, unbepflanzt
BO5	Isolat	Acker In der Venne	12.05.2006	Boden, bepflanzt

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen zum Säulenversuch**

Die Ergebnisse des Säulenversuchs müssen unter Berücksichtigung der Bedingungen in der Säule interpretiert werden, die sich nach dem ersten Starkregenereignis veränderten. Der Gülle- und damit verbundene Nährstoffeintrag führte im Boden zu verstärkter mikrobieller Aktivität, so dass der vorhandenen Sauerstoff verbraucht wurde. Es bildete sich dadurch mehr und mehr ein anaerobes Milieu, in dessen Folge es zur Ausfällung von zweiwertigem Eisen kam [Büchner 2006]. Dies führte zu einer nicht abschätzbaren Beeinflussung der Mikroorganismen.

#### **4.1.1 KBE-Zahlen**

Die Zahl vermehrungsfähigen Zellen ist in der aufgetragenen Gülle mit über 41 Mio KBE/ml auf DEV-Agar sehr hoch (Ergebnisse in Anhang E). Aber auch im Boden, der in die Säule eingebaut wird, lag die Zahl mit über 4 Mio KBE/ml hoch. Nach verschiedenen Berechnungen wurde der Boden 10 Wochen später wieder ausgebaut und die Zahl der Mikroorganismen hatte sich im Boden geringfügig auf 1,8 Mio KBE/ml auf DEV-Agar verringert (Abb. 4.1.1.1). Die Sickerwasserproben zeigten deutlich geringere Zahlen koloniebildender Einheiten. In der ersten Probe wurden noch knapp 80.000 KBE/ml mit dem Sickerwasser ausgetragen. In den Proben SR2, SR3 und SR4 wurden nur 3.000-8.000 KBE/ml gemessen.

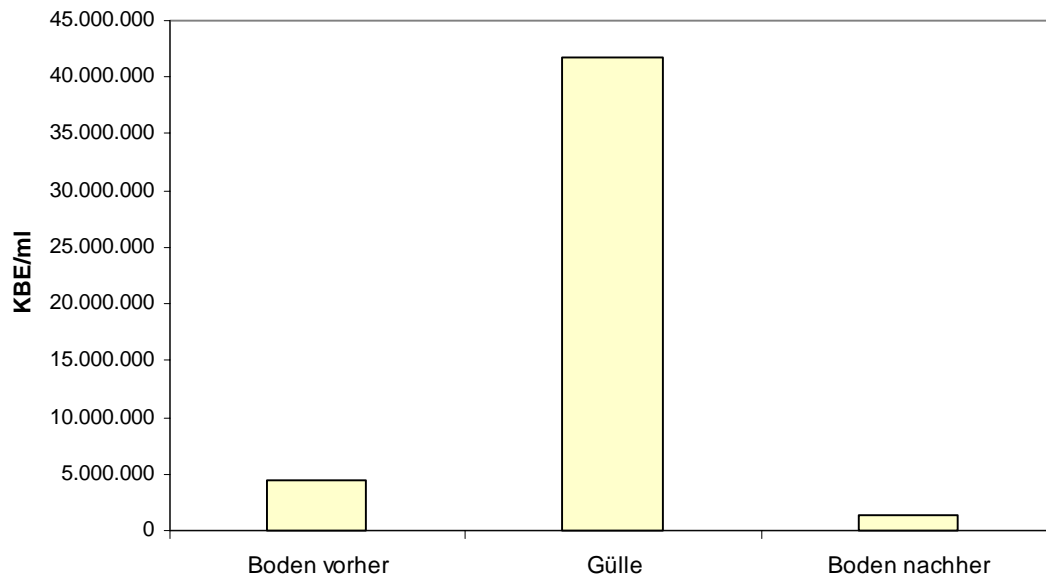


Abb. 4.1.1.1: KBE-Zahlen von Gülle und Boden aus dem Säulenversuch

Die KBE-Zahlen auf R2A-Agar sind bis auf leichte Abweichungen zu den KBE-Zahlen auf DEV-Agar gleich (siehe Anhang E). Die KBE-Zahlen auf Endo-Agar, die die Besiedlung mit coliformen Bakterien und E.coli zeigt, sind gering. Nur bei der Gülleprobe liegt die Zahl mit 1.750 KBE/ml hoch. In den Sickerwasserproben waren nur einzelne Kolonien nachweisbar. Im Boden sind vor und nach dem Säulenversuch keine coliformen Bakterien und E.coli nachweisbar.

Berechnet man aus den KBE-Zahlen die prozentualen Anteile CTC-resistenter Mikroorganismen auf DEV-Agar erhält man die in Abb. 4.1.1.2 dokumentierten Ergebnisse. Die KBE-Zahlen der auf Nährmedien denen iCTC und SFD zugesetzt wurden entsprechen zumeist den KBE-Zahlen der Nährmedien ohne Antibiotikazusatz oder übersteigen diese sogar. Die berechneten prozentualen Anteile sind daher wenig aussagekräftig und daher nicht aufgeführt.

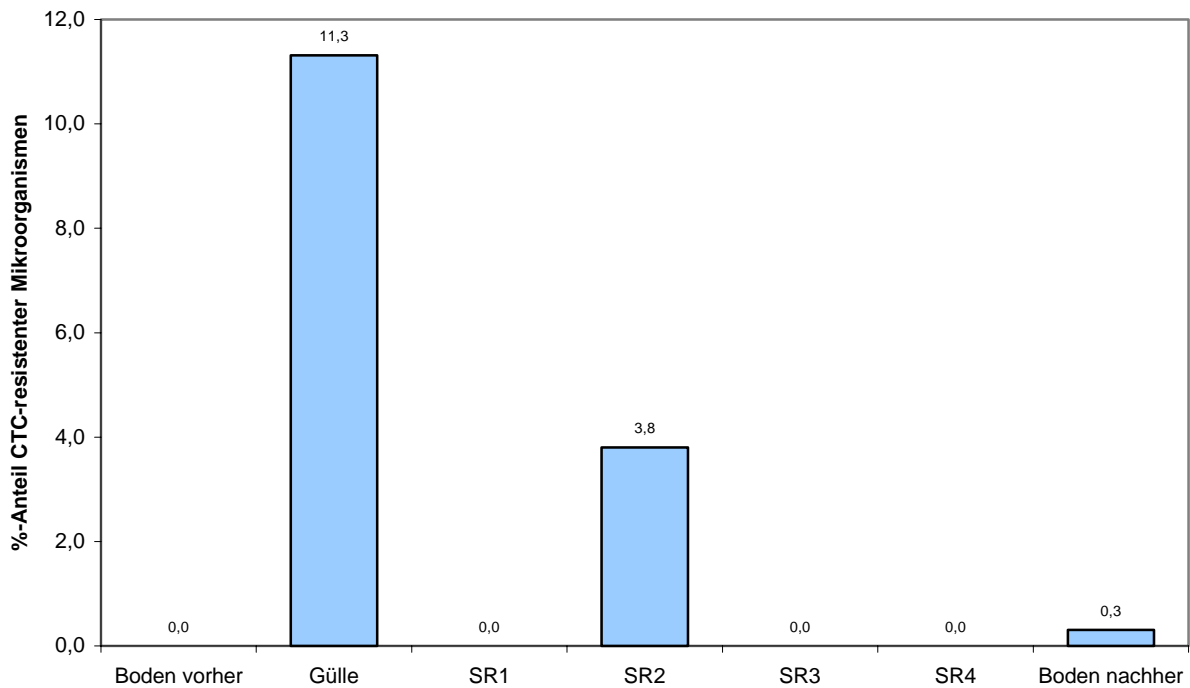


Abb. 4.1.1.2: Prozentanteil CTC-resistenter Mikroorganismen auf DEV-Agar

Im Boden, der in die Säule eingebaut worden ist, waren vor dem Säulenversuch keine CTC-resistenten Mikroorganismen vorhanden. In der Gülle wurden CTC-resistente Mikroorganismen zu einem Anteil von 11,3% nachgewiesen (Abb. 4.1.1.2). Nur in der Sickerwasserprobe vom Starkregen 2 wurden 3,8% CTC-resistente Mikroorganismen nachgewiesen, in den anderen Sickerwasserproben waren keine vorhanden. Im nach Beendigung des Versuchs ausgebauten Boden wurden 1,1% CTC-resistente Mikroorganismen nachgewiesen. In der eingesetzten Gülle konnten über 4 Mio KBE/ml CTC-resistente Mikroorganismen nachgewiesen werden. Im Boden nach dem Versuch waren 20.000 KBE/ml CTC-resistente zu finden (Anhang E).

#### 4.1.2 Esterase-Aktivitäten

Die Esterase-Aktivität der aufgetragenen Gülle war mit 29239,47 ng/ml/h sehr hoch. Die geringe Esterase-Aktivität des Bodens von 35,4 ng/ml/h vor dem Versuch, war bis zum Ende des Versuches nur wenig auf 108-190 ng/ml/h (je nach Bodentiefe) erhöht. In den höheren Bodenschichten ist die Esterase-Aktivität mit 190,49 ng/ml/h bei 5-10 cm Bodentiefe und 140,55 ng/ml/h bei 0-5 cm Bodentiefe nur leicht erhöht gegenüber der Esterase-Aktivität in den unteren Bodenschichten mit Werten von 108,67 ng/ml/h in 10-20 cm Tiefe, 126,04 ng/ml/h in 20-30 cm Tiefe und 117,33 ng/ml/h in 40-50 cm Tiefe (Abb. 4.1.2.1). Die Werte 2-5 ng/ml/h der Sickerwasserproben sind als sehr gering einzustufen.

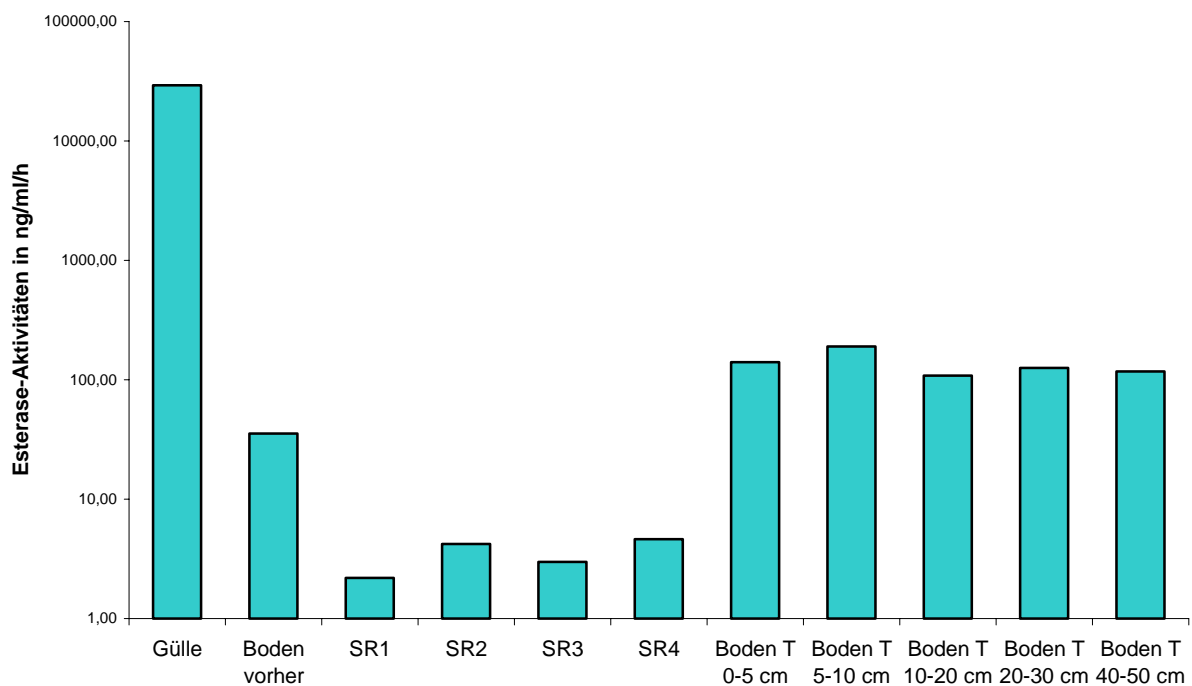


Abb. 4.1.2.1: Logarithmische Darstellung der Esterase-Aktivitäten der Proben aus dem Säulenversuch

### 4.1.3 MHK isolierter Bakterien

CTC-resistente Mikroorganismen wurden in der Gülle nachgewiesen. Die Einzelkolonien aus der Gülle, die auf Enterokokken-Selektivagar und E.coli-Selektivagar (Endo-Agar) kultiviert wurden, wurden auch als resistent eingestuft. Sowohl aus der Gülle isolierten Enterokokken als auch die coliformen Bakterien und E.coli sind CTC-resistent (Tab. 4.1.3.1). Die SR2a-Iso, SR2b-Iso und SR2c-Iso waren Bakterienisolate von Einzelkolonien einer Sickerwasserprobe, die beim 2. Starkregenereignis des Säulenversuches genommen worden ist. Die analysierten Bakterienisolate waren sensibel gegenüber Chlortetracyclin.

Tab. 4.1.3.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus dem Säulenversuch

Bakterienisolat	MHK in mg/l	Ergebnis MHK-Best.
DEV-Isolat der Gülle	> 32	resistent
Enterokokken-Isolat der Gülle	8	resistent
Endo-Agar-Isolat der Gülle	16	resistent
DEV-Isolat a von SR2	< 1	sensibel
DEV-Isolat b von SR2	< 1	sensibel
DEV-Isolat c von SR2	< 1	sensibel

#### 4.1.4 Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR

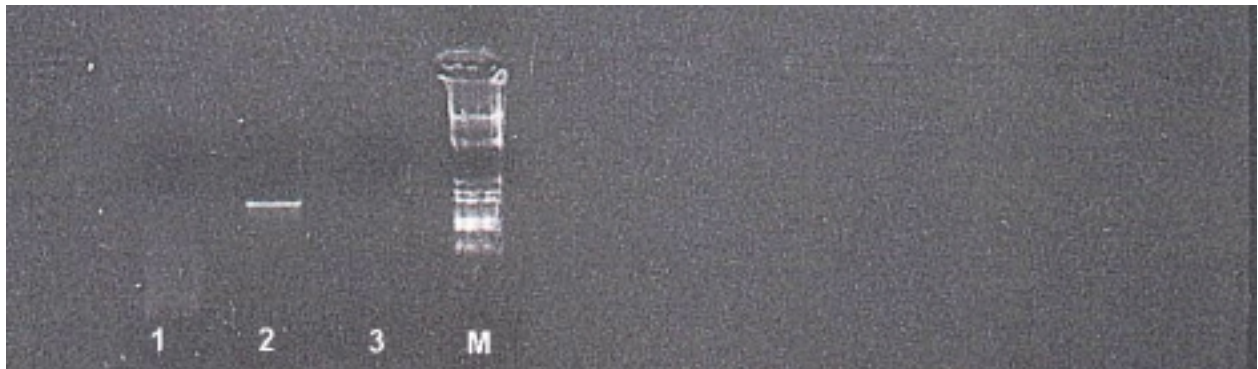


Abb. 4.1.4.1: Banden mit Ribo-2-Primern auf Agarosegel (1: Gülle pur, 2: DEV-Isolat der Gülle, 3: neg. Kontrolle, M: Marker)

Tab. 4.1.4.1: Ergebnisse der PCR von Proben und Bakterienisolaten aus dem Säulenversuch

Probe bzw. Bakterienisolat	PCR mit Ribo-2	PCR mit Tet M
Gülle pur	neg.	-
DEV-Isolat der Gülle	pos.	pos.
Enterokokken-Isolat der Gülle	pos.	pos.
Endo-Agar-Isolat der Gülle	neg.	-
Boden vorher	neg.	-
SR1	neg.	-
SR2	neg.	neg.
DEV-Isolat a von SR2	neg.	neg.
DEV-Isolat b von SR2	neg.	neg.
DEV-Isolat c von SR2	neg.	neg.
Boden nachher T 0-5 cm	neg.	-
Boden nachher T 5-10 cm	neg.	-
Boden nachher T 10-20 cm	neg.	-
Boden nachher T 20-30 cm	neg.	-
Boden nachher T 40-50 cm	neg.	-

- : nicht untersucht

Mit dem degenerierten Primerpaar Ribo-2 wird ein PCR-Produkt mit einer Länge von 1000-1500 bp amplifiziert, wenn eines der RPP-Resistenzgene Tet M, O, P, Q, S, T oder W im Bakterium vorhanden ist. Im Vergleich mit dem Größenmarker zeigt sich eine solche Bande (Abb. 4.1.4.1). In der Gülle ist ein Tetracyclin-Resistenzgen der Klasse RPP vorhanden. Damit ist aber noch nicht klar, um welches der RPP-Resistenzgene es sich handelt. Daher wurde die PCR mit den Primerpaaren für Tet M, Tet O, Tet Q und Tet W wiederholt. In der Gülleprobe ergab die PCR ein positives Ergebnis für Tet M, ein Amplicon mit einer Länge von ca. 170 bp (Abb. 4.1.4.2).

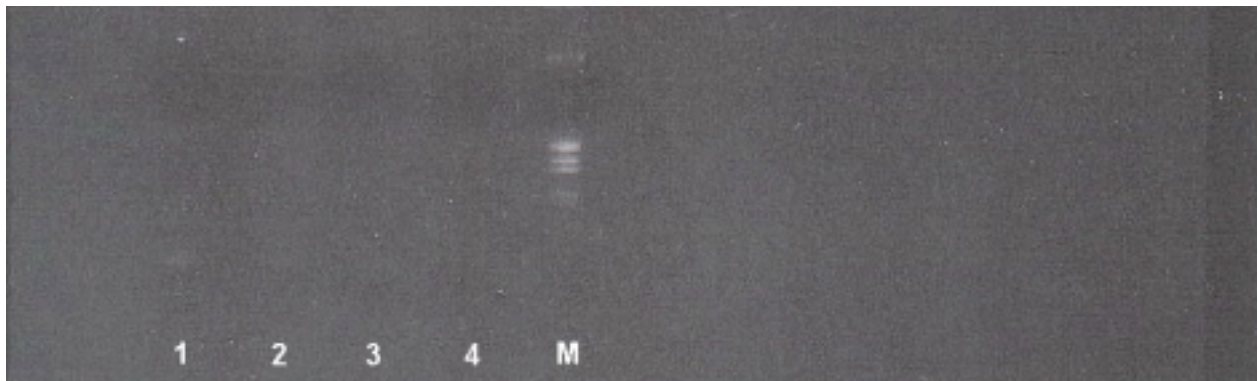


Abb. 4.1.4.2: Banden von Tet M-Primern auf Agarosegel (1: DEV-Isolat von Gülle 1  $\mu$ l, 2: DEV-Isolat von Gülle 0,1  $\mu$ l, 3: DEV-Isolat von Gülle 0,01  $\mu$ l, 4: neg. Kontrolle, M: Marker)

Da die Bande auf dem Agarosegel nur sehr schwach zu erkennen war, wurde das PCR-Produkt von SEQLAB sequenziert worden. Beim Vergleich der Sequenz des amplifizierten DNA-Stranges mit dem DNA-Strang den die Primer Tet M-FW und Tet M-RV amplifizieren, war eine hohe Übereinstimmung zu erkennen. Der amplifizierte DNA-Strang war Tet M. Die aus der Gülle isolierten Enterokokken zeigten auch ein PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 170 bp, bei dem es sich um das Tetracyclin-Resistenzgen Tet M handelt. Ein Tetracyclin-Resistenzgen aus den E.coli-Isolaten der Gülle konnte nicht nachgewiesen werden. In den Boden- und Sickerwasserproben aus dem Säulenversuch konnte keines der analysierten Tetracyclin-Resistenzgene detektiert werden.

## 4.2 Resistenzuntersuchungen zum Freilandversuch

### 4.2.1 MHK isolierter Bakterien

Die isolierten Mikroorganismen aus der Gülle haben eine MHK von  $> 32$  mg/l und sind daher eindeutig als resistent einzustufen (Tab. 4.2.1.1).

In 6 der 7 Bodenproben sind ebenfalls CTC-resistente Mikroorganismen nachweisbar. Die einzige Bodenprobe, in der keine resistenten Mikroorganismen nachgewiesen wurden, ist Boden 1, die 0-Probe vor der ersten Güllebeaufschlagung. Die resistent eingestuften Proben Boden 2-7 wurden alle nach Beaufschlagung mit der Gülle, die CTC-resistente Mikroorganismen enthält (s.o.), genommen.

Tab. 4.2.1.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus dem Freilandversuch

Bakterienisolat	MHK in mg/l	Ergebnis MHK-Best.
Gülle pur	-	-
DEV-Isolat der Gülle	> 32	resistent
Probe 4 Gülle pur	1	intermediär
Probe 5 Gülle pur	1	intermediär
Boden 1 0-Probe	2	intermediär
Boden 2 1. Güllung	> 32	resistent
Boden 3 nach 1.G.	16	resistent
Boden 4 2. Güllung	> 32	resistent
Boden 5 nach 2.G.	> 32	resistent
Boden 6 nach 2.G.	> 32	resistent
Boden 7 nach 2.G.	> 32	resistent

- : nicht untersucht

## 4.2.2 Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR

Tab. 4.2.2.1: Ergebnisse der PCR von Proben und Bakterienisolaten aus dem Freilandversuch

Probe bzw. Bakterienisolat	PCR mit Ribo-2	PCR mit Tet M
Gülle pur	pos.	neg.
DEV-Isolat der Gülle	pos.	pos.
Probe 4 Gülle pur	pos.	-
Probe 5 Gülle pur	pos.	-
Boden 1 0-Probe	-	-
Boden 2 1. Güllung	neg.	-
Boden 3 nach 1.G.	neg.	-
Boden 4 2. Güllung	neg.	-
Boden 5 nach 2.G.	neg.	-
Boden 6 nach 2.G.	neg.	-
Boden 7 nach 2.G.	neg.	-

- : nicht untersucht

Das positive Ergebnis mit den Ribo-2 Primern zeigt das in der Gülle ein Tetracyclin-Resistenzgen der Klasse RPP vorhanden ist (Abb. 4.2.2.1). Wurde die Gülle pur in der PCR-Aufarbeitung eingesetzt, konnte das Tet M nicht nachgewiesen werden. Die zuvor auf DEV-Agar kultivierten Bakterienisolate aus der Gülle zeigten ein Amplicon, dass Tet M entspricht.

In den Gülleproben Probe 4 und Probe 5, die auch Sammelproben aus dem Projekt in Paderborn sind, wurde ein PCR-Produkt mit der richtigen Länge amplifiziert (Abb. 4.2.2.1). Damit wurde auch in diesen Proben eine RPP-Resistenzgen nachgewiesen.

In den Bodenproben ließen sich keine Tetracyclin-Resistenzgene nachweisen.

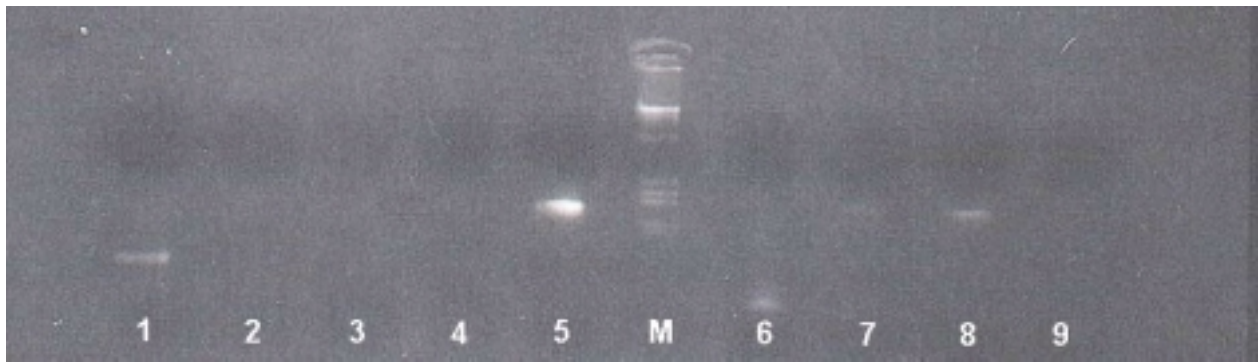


Abb. 4.2.2.1: Banden mit Ribo-2-Primern auf Agarosegel (1: OW 5, 2: BO 3 MM, 3: BO 4 MM, 4: BO 5MM, 5: DEV-Isolat der Gülle (Pad), M: Marker, 6: Endo-Isolat der Gülle (Säulenversuch), 7: Probe 4 Gülle pur, 8: Probe 5 Gülle pur, 9: neg. Kontrolle )

### 4.3 Resistenzuntersuchungen zum Batchversuch

#### 4.3.1 MHK isolierter Bakterien

Zwei Bakterienisolate aus dem Batchversuch sind CTC-resistent. Beides sind Mikroorganismen aus Bodenproben. Die anderen Bakterienisolate von Boden-, Grundwasser- und Oberflächenwassermikroorganismen sind sensibel gegenüber CTC.

Tab. 4.3.1.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus dem Batchversuch

Bakterienisolat	MHK in mg/l	Ergebnis MHK-Best.
BI 1 MM (GW)	< 1	sensibel
BI 5 MM (OW)	< 1	sensibel
BI 6 MM (BO)	< 1	sensibel
BI 7 MM (BO)	> 32	resistent
BI 8 MM (BO)	> 32	resistent
BI 19 MM (GW)	< 1	sensibel

#### 4.3.2 Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR

In keinem der Bakterienisolate konnte ein Tetracyclin-Resistenzgen nachgewiesen werden. Die Isolate wurden darüber hinaus auch mit den anderen am IfW vorhandenen Primerpaaren analysiert. Es sind Analysen mit Tet H, Tet L, Tet O, Tet Q, Tet W, als auch mit Tet M und Ribo-2, wie in Tabelle 4.3.2.1 gezeigt, durchgeführt worden. Auch dabei ist kein Tetracyclin-Resistenzgen nachgewiesen worden.

Tab. 4.3.2.1: Ergebnisse der PCR von Bakterienisolaten aus dem Batchversuch

Bakterienisolat	PCR mit Ribo-2	PCR mit Tet M
BI 1 MM (GW)	neg.	neg.
BI 5 MM (OW)	neg.	neg.
BI 6 MM (BO)	neg.	neg.
BI 7 MM (BO)	neg.	neg.
BI 8 MM (BO)	neg.	neg.
BI 19 MM (GW)	neg.	neg.

## 4.4 Resistenzuntersuchungen von Umweltproben

### 4.4.1 MHK isolierter Bakterien

Tab. 4.4.1.1: Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Bakterienisolaten aus Umweltproben

Bakterienisolat	MHK in mg/l	Ergebnis MHK-Best.
OW1	2	intermediär
OW 2	4	intermediär
OW 3	4	intermediär
OW 4	1	intermediär
OW 5	8	resistent
GW 1	< 1	sensibel
GW 2	2	intermediär
BO 1 MM	2	intermediär
BO 2 MM	< 1	sensibel
BO 3 MM	< 1	sensibel
BO 4 MM	< 1	sensibel
BO 5 MM	< 1	sensibel

Die Oberflächenwasserproben sind von ausgewählten Oberflächengewässern genommen worden, die in direkter Nähe zu landwirtschaftlich genutzten Flächen liegen. Von den Ackerböden können durch Regen und Bewässerung Mikroorganismen aus der aufgebrachten Gülle oder aus dem Boden in die Gewässer eingetragen werden. Bei der Probe OW 5 sind CTC-resistente Mikroorganismen in den Bakterienisolaten mit der MHK-Bestimmung nachweisbar. Die Bakterienisolate der anderen Wasserproben sind als intermediär einzustufen.

Die aus den zwei Grundwasserproben kultivierten Bakterienisolate sind sensibel bzw. intermediär gegenüber Chlortetracyclin.

Die Bakterienisolate der Bodenproben sind sensibel (nur eine intermediär).

## 4.4.2 Nachweis von Resistenzgenen mit der PCR

Tab. 4.4.2.1: Ergebnisse der PCR von Bakterienisolaten aus Umweltproben

<b>Bakterienisolat</b>	<b>PCR mit Ribo-2</b>	<b>PCR mit Tet M</b>
OW1	neg.	-
OW 2	neg.	-
OW 3	neg.	-
OW 4	-	-
OW 5	neg.	-
GW 1	-	-
GW 2	-	-
BO 1 MM	-	-
BO 2 MM	-	-
BO 3 MM	neg.	-
BO 4 MM	neg.	-
BO 5 MM	neg.	-

- : nicht untersucht

In den Bakterienisolaten der Umweltproben konnte keines der analysierten Tetracyclin-Resistenzgene amplifiziert werden. Da schon in der MHK-Bestimmung nur in einer Probe CTC-resistente Mikroorganismen nachgewiesen wurden, wurde teilweise keine PCR mehr durchgeführt.

# 5 Diskussion

## 5.1 Diskussion der Methoden

### 5.1.1 KBE-Zahl-Bestimmung

Die Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) dient der Quantifizierung der Lebendbakterienzahlen. Die Methode ist einfach und schnell durchzuführen.

Die Bestimmung antibiotikaresistenter Mikroorganismen durch die Ermittlung der KBE-Zahlen im Vergleich von antibiotikahaltigem und antibiotikafreiem Nähragar konnte nur für CTC-resistente Mikroorganismen angewendet werden. Die Nährmedien denen iCTC und SFD zugesetzt worden ist, zeigten keinen Unterschied beim Wachstum im Vergleich zu Nährmedien ohne Antibiotikazusatz. Im Gegenteil, teilweise wuchsen auf den Nährmedien mit SFD-Zusatz sogar weitaus mehr Mikroorganismen als auf den SFD-freien, ebenso bei iso-CTC (siehe Anhang). Bei iCTC war dies zu erwarten, da das iCTC als Metabolit des eigentlichen Wirkstoffes CTC keine antibiotische Wirkung aufweist [Thiele-Bruhn 2003a]. Bei SFD müsste die antibiotische Wirksamkeit aber zu beobachten sein. Das dies nicht so ist, kann zum einen daran liegen, dass die Konzentration von 10 µg/ml beim Wirkstoff SFD zu gering ist, dass die Mikroorganismen in ihrem Wachstum nicht beeinflusst werden. Ein weiterer Grund könnte sein, dass SFD im Nährmedium nicht wirksam ist, weil es z. B. zersetzt oder an andere Stoffe fest gebunden wird. Auch Kutzera 2005 stellte bei seinen Untersuchungen fest, dass SFD keine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen auf Nährmedien hat. Es ist aber zu vermuten, dass die antibiotische Wirkung des SFD weniger stark ist als die des CTC. Kutzera 2005 vermutete außerdem, dass sich CTC und SFD in ihrem Sorptionsverhalten im Nährmedium unterscheiden. Des SFD wird im Nährmedium stärker sorbiert. Da gerade zu den Eigenschaften und dem Verhalten von SFD noch sehr wenig bekannt ist, kann dieser Aspekt hier nicht abschließend geklärt werden.

Bei den Nährmedien, denen CTC zugegeben worden ist, zeigt sich ein ganz anderes Bild. Eine Konzentration von 10 µg/ml hemmt das Wachstum der Mikroorganismen. Mikroorganismen die sensibel gegenüber CTC sind bilden keine Kolonien auf dem CTC-Nährmedium aus. Durch

Herstellung von Verdünnungsreihen lassen sich die Zahlen resistenter Bakterien relativ genau quantifizieren. Es können aber nur die auf DEV-Nährmedium kultivierbaren Mikroorganismen erfasst werden. Durch Kultivierung auf selektiven Nährmedien, wie Endo-Agar oder Enterokokken-Selektivagar, können aber definierte Bakterienklassen bestimmt werden.

### **5.1.2 Esterase-Aktivität**

Die Esterase-Aktivität ist ein Summenparameter für die mikrobielle Aktivität von Umweltproben. Sie zeigt welchen Effekt eine Veränderung in einer Probe auf die Aktivität der Mikroorganismen hat. Die Methode gibt aber keine genaue Zahl an, wie viele Mikroorganismen vorhanden sind. Zusammen mit der Bestimmung der KBE-Zahlen ist eine quantitative Aussage über den Effekt eingebrachter Stoffe auf die Aktivität der Mikroorganismen möglich, da der Vergleich der KBE-Zahlen mit der Aktivität der Probe möglich ist.

### **5.1.3 MHK-Bestimmung**

Die MHK-Bestimmung wurde für SFD mit verschiedenen Boden-, Wasser- und Gülleproben durchgeführt. Es wurden DEV-Nährmedien mit Konzentrationen von 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/l hergestellt. Bei allen Konzentrationen konnte ein starkes Wachstum festgestellt werden. Es wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen sichtbar. Auch die antibiotikasensiblen Referenzstämme *Enterococcus faecalis* (DSM 2570) und *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1117) zeigten keine Beeinflussung des Wachstums bis zur höchsten Konzentration von 64 mg/l. Eine Bestimmung der MHK in bezug auf SFD und iso-CTC ist aus diesen Gründen nicht möglich. Für die Bestimmung von SFD-resistenten Mikroorganismen fehlen Standardvorgaben und Vergleichsdaten.

Die MHK-Bestimmung lässt sich als genormte Methode jedoch gut zur Bestimmung CTC-resistenter Organismen einsetzen. Die Unterscheidung von Wachstum und minimalem Wachstum bzw. keinem Wachstum ist eindeutig bestimmbar (vergleiche Abb. 3.4.1.). Die Methode ist einfach durchzuführen, benötigt aber einen hohen Zeitaufwand, da die Proben vor der Analyse noch kultiviert werden müssen. Zur Zeitersparnis könnte noch untersucht werden, ob die Proben auch ohne vorherige Kultivierung in der MHK-Bestimmung eingesetzt werden können.

Über die Zahl an resistenten Mikroorganismen kann die Methode allerdings keine Auskunft geben. Die Bestimmung der MHK ist zur Bestimmung von resistenten Bakterien mit der Einschränkung, dass nur die kultivierbaren Bakterien erfasst werden können, geeignet. Mit dieser Methode kann durch vorgehende Kultivierung auf entsprechendem Selektivnähragar die resistenztragende Bakterienklasse bestimmt werden.

#### **5.1.4 PCR**

In keiner der in der PCR eingesetzten Proben und Bakterienisolate konnte ein Sulfonamid-Resistenzgen amplifiziert werden.

Trotz Problemen mit den Matrizes Gülle und Boden konnten Tetracyclin-Resistenzgene mit den degenerierten Primern Ribo-2 und den spezifischen Primern Tet-M nachgewiesen werden. Die Matrix der Gülle- und Bodenproben bereitete durch die hohe Zahl an Störstoffe (Huminstoffe) bei der PCR Probleme, die aber durch vorangestellte Kultivierung eliminiert werden konnten.

Da es sich bei dem Ribo-2 Primerpaar um ein stark degenerierten Primer handelt, ist ein falsch positives Ergebnis denkbar. Auch wenn die Länge des Amplicons bei der Gelelektrophorese den in der Literatur genannten 1000-1500 bp entspricht, ist das kein eindeutiger Beweis für die Anwesenheit eines der RPP-Resistenzgene. Allerdings ist in den Gülleproben, die mit dem Ribo-2 Primerpaar PCR-Produkte zeigten, auch mit dem Tet M-Primerpaar ein Amplicon mit der richtigen Länge von 170 bp analysiert worden. Dieses Primerpaar ist so spezifisch, das ein falsch positives Ergebnis mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Eine Sequenzanalyse des mit der PCR amplifizierten Amplicons Tet M zeigte eindeutig, dass es sich um Tet M handelt.

Die Probenaufarbeitung wurde für Wasserproben entwickelt und könnte daher auch zu Problemen bei der Aufarbeitung von Gülle- und Bodenproben geführt haben. Da kein Vergleich zu anderen Aufarbeitungsmethoden vorliegt, kann dieser Einfluß auf die PCR hier nicht bewertet werden. Eine Optimierung der PCR-Probenaufarbeitung für Gülle- und Bodenproben oder der Einsatz eines anderen, speziell für diese Matrizes entwickelten Aufarbeitungskits sollte durchgeführt werden.

Die PCR-Methode ist aufgrund der Vielfalt der möglichen Resistenzgene zur summarischen Bestimmung von resistenten Bakterien nicht geeignet. Für die Bestimmung von spezifischen Resistenzgenen ist sie die Methode der Wahl. Zur Bewertung einer Weitergabe von Resistenzgenen ist dieses Verfahren die einzig einsetzbare Methode, da sie die der Resistenz zugrunde liegenden genomischen Strukturen wiedergibt. Eine Unterscheidung von resistenzauslösenden Faktoren ist nur so möglich. Mit einer Weiterentwicklung der Methode kann durch Einsatz der Real-Time PCR eine quantitative Analyse der Resistenzgene gemacht werden. So wäre zudem eine präzise Aussage über die Auswirkungen von Gülleaufbringung auf die Resistenzentwicklung der Bodenmikroorganismen oder eine mögliche Weitergabe von Resistenzfaktoren an die Bodenmikroorganismen möglich.

Falsch negative Ergebnisse können bei der PCR schon wegen der geringen Probemenge nicht ausgeschlossen werden. Durch Verdünnungseffekte könnte der gesuchte DNA-Abschnitt auch gar nicht in die PCR gelangt sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass in der Probe so viel DNA vorhanden ist, dass die Polymerase und die Primer nicht an der spezifischen Stelle der DNA renaturieren können und es daher nicht zu einer Vermehrung des gesuchten DNA-Abschnitts kommt. Diese Probleme vor allem bei Proben in denen sehr viel DNA vorhanden ist, wie es in Gülle und Boden der Fall ist, waren bekannt. Die Möglichkeit hemmender Effekte durch Störstoffe aus der Probe, wie etwa Huminstoffe in Bodenproben kann ausgeschlossen werden, da nicht die reine Probe in der DNA-Aufarbeitung eingesetzt wird, sondern einige zuvor auf Nähragar angezüchtete Mikroorganismenkolonien.

Winkler et al. 2004 erkannte schon in seinen Untersuchungen auf Tetracyclin-Resistenzgene in Bodenproben, dass diese nur sporadisch nachweisbar sind. Als Probleme wurden die Diversität im Boden, das geringe Probenvolumen und die geringe Größe der Resistenz tragenden Mikroorganismen von wenigen  $\mu\text{m}$  genannt.

Die PCR ist als Nachweisverfahren für die Summe der resistenten Mikroorganismen ungeeignet. Es gibt zu viele verschiedene Tetracyclin-Resistenzgene, die dann alle überprüft werden müssten. In dieser Arbeit sind sechs häufig vorkommende Resistenzgene ausgewählt worden. Nur in der Gülle konnte das Tet M nachgewiesen werden. Die anderen Resistenzgene konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. Auch die schon von Winkler et al. 2004 angegebenen Probleme bei der Bestimmung von Resistenzgenen (s.o.) sind hierbei zu beachten.

## 5.1.5 Vergleich von MHK-Bestimmung und PCR

Tab. 5.1.5.1: Vergleich von MHK und PCR

Probe bzw. Bakterienisolat	Ergebnis MHK	Ergebnis PCR
Gülle pur	resistent	pos.
DEV-Isolat der Gülle	resistent	pos.
Probe 4 Gülle pur	intermediär	neg.
Probe 5 Gülle pur	intermediär	neg.
Boden 2 1. Güllung	resistent	neg.
Boden 3 nach 1.G.	resistent	neg.
Boden 4 2. Güllung	resistent	neg.
Boden 5 nach 2.G.	resistent	neg.
Boden 6 nach 2.G.	resistent	neg.
Boden 7 nach 2.G.	resistent	neg.
BI 1 MM (GW)	sensibel	neg.
BI 5 MM (OW)	sensibel	neg.
BI 6 MM (BO)	sensibel	neg.
BI 7 MM (BO)	resistent	neg.
BI 8 MM (BO)	resistent	neg.
BI 19 MM (GW)	sensibel	neg.
DEV-Isolat von Gülle (Säule)	resistent	pos.
Enterokokken-Isolat der Gülle (Säule)	resistent	pos.
Endo-Agar-Isolat der Gülle (Säule)	resistent	neg.
DEV-Isolat a von SR2	sensibel	neg.
DEV-Isolat b von SR2	sensibel	neg.
DEV-Isolat c von SR2	sensibel	neg.
OW1	intermediär	neg.
OW 2	intermediär	neg.
OW 3	intermediär	neg.
OW 5	resistent	neg.
BO 3 MM	sensibel	neg.
BO 4 MM	sensibel	neg.
BO 5 MM	sensibel	neg.

Bei der MHK-Bestimmung können nur kultivierbare Mikroorganismen bestimmt werden. Wenn nicht kultivierbare, aber resistente, Mikroorganismen in einer Probe vorhanden sind, wachsen diese nicht auf dem Nährmedium. Nicht kultivierbare Mikroorganismen werden daher mit der MHK-Bestimmung nicht erfasst. Die nicht kultivierbaren Mikroorganismen wurden in der PCR erfasst, da die DNA aller in der Probe vorhandenen Organismen isoliert und in die Analyse einbezogen wurden. Als Beispiel dafür gelten zwei der drei Gülleproben aus dem Freilandversuch, die in der MHK-Bestimmung als intermediär eingestuft worden sind, in der PCR lassen sich aber Tetracyclin-Resistenzgene nachweisen (Tab. 5.1.5). Dazu ist allerdings die direkte Aufarbeitung der Proben nötig. Dies wurde bei den meisten Proben nicht gemacht, da die Huminstoffe, die in der PCR hemmend wirken können, aus den Proben herausgehalten werden sollten. Dazu wurden die Proben zuerst auf DEV-Nähragar angezüchtet und wurden dann erst

zur Probenaufarbeitung eingesetzt. Somit wurden auch in der PCR zum großen Teil nur kultivierbare Mikroorganismen nachgewiesen.

Die MHK-Bestimmung erkennt alle kultivierbaren resistenten Bakterien. Wenn die Bakterien bei einer bestimmten Konzentration des Antibiotikum auf dem Nährmedium wachsen, sind sie resistent dagegen. Wenn sie nicht wachsen sind sie sensibel. Bei der PCR, die bestimmte Resistenzgene der Bakterien nachweist, wird das Resistenzgen amplifiziert, wenn es vorhanden ist. Es gibt aber 36 verschiedene Resistenzgene, die nicht alle überprüft werden konnten. Somit konnte man bei einem negativen Ergebnis in der PCR nicht das Vorkommen resistenter Bakterien ausschließen. Die Proben wurden auf 6 verschiedene Resistenzgene untersucht. Wenn keines dieser 6 gefunden wurde, dann können immer noch 30 andere Resistenzgene vorhanden sein. Beide Verfahren bestimmen alle Bakterienklassen. Eine Aussage darüber um welche Bakterien es sich handelt ist nur möglich, wenn die Bakterien vor der Analyse selektiert werden. Dies wurde z.B. durch Anzüchten von Bakterienkolonien auf einem selektiven Nährboden (Endo-Agar: Coliforme und E.coli; Enterokokken-Selektivagar: Enterokokken) gemacht.

Es gab in den Untersuchungen mehrfach positive Ergebnisse in der MHK-Bestimmung, die nicht durch ein mit der PCR nachgewiesenes Resistenzgen bestätigt werden konnten (E.coli-Isolat aus Gülle, Bodenproben aus Freilandversuch, Oberflächenwasserprobe aus Umwelt, siehe Tabelle 5.1.5). Da in der PCR nur wenige (6) der 36 Resistenzgene überprüft werden können, kann es sein das in den als resistent eingestuften Bakterien andere Tetracyclin-Resistenzgene für die Resistenz kodieren. Die PCR-Aufarbeitung der Proben, die mit dem QIAamp DNA Blood Kit 50 durchgeführt wurde, ist für Wasserproben entwickelt worden und könnte daher auch einen Einfluss auf die Ergebnisse der PCR haben. Es könnte aber auch an einer geringeren Empfindlichkeit der PCR gegenüber der MHK-Bestimmung liegen.

## 5.2 Diskussion der Untersuchungsergebnisse

### 5.2.1 Diskussion der Ergebnisse aus den mikrobiologischen Untersuchungen des Säulenversuches

Die hohe Besiedlungszahl in der Gülle ist darauf zurückzuführen, dass die Tiere sehr viele Mikroorganismen mit Faeces und Urin ausscheiden. Die in den Ausscheidungen reichlich vorhandenen Nährstoffe erhöhen zudem die Zahl der Mikroorganismen. Auch über einen langen Zeitraum der Lagerung hinweg nimmt die hohe Dichte der Mikroorganismen in der Gülle kaum ab.

Auch im Boden finden viele mögliche Nahrungsquellen, so dass auch hier hohe Besiedlung im Millionenbereich pro Milliliter nicht ungewöhnlich sind. Es liegt zwar nahe, dass die Anzahl der Mikroorganismen durch den Gülleeintrag steigt, aber die Abnahme der Besiedlung im Boden nach dem Säulenversuch hat verschiedene Gründe. Nur eine vergleichsweise geringe Auswirkung hat der Austrag über das Sickerwasser, da nur wenige Mikroorganismen ausgewaschen werden, wie die KBE-Zahlen zeigen (Tab. 4.1.1.1). Da der Gülle die Antibiotika SFD und CTC zugesetzt worden sind, ist eine Verminderung der koloniebildenden Einheiten zu erwarten. Wenn die Konzentrationen der mit der Gülle eingetragenen Wirkstoffe hoch genug ist, werden die nicht resistenten Mikroorganismen in Wachstum und Vermehrung gehemmt. Weiteren Einfluss auf die Zahl der Mikroorganismen hat die chemische Veränderung in der Säule. Die zunehmend anaeroben Bedingungen führen zu einer Abnahme bestimmter Bakterienarten, die Sauerstoff brauchen.

In den Sickerwasserproben konnte zu Beginn ein starker Durchbruch von Mikroorganismen beobachtet werden (siehe Anhang E). Beim zweiten, dritten und vierten Starkregenereignis wurden nur noch weniger als ein Zehntel der Zahl der Mikroorganismen ausgetragen, die beim 1. Starkregen ausgetragen wurden. Für Wasserproben sind die KBE-Zahlen aller Regenereignisse mit mehreren tausend KBE/ml sehr hoch und nur durch die aufgebrachte Gülle denkbar. Der Eintrag von Mikroorganismen in das Grundwasser und damit auch ein Eintrag von resistenten Mikroorganismen kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Gülleprobe waren auf dem CTC-Nährmedium über 4 Mio KBE/ml, beim Nährmedium ohne Antiotikazusatz wurden über 40 Mio KBE/ml ausgezählt (Anhang E). Dies entspricht einem Anteil von 11,3% CTC-resistenter Mikroorganismen an der Gesamtbesiedlung.

Auch im Boden konnten nach Beendigung des Versuches 20.000 KBE/ml CTC-resistente Mikroorganismen gezählt werden, vor dem Versuch sind keine KBE auf dem CTC-Nähragar gewachsen. Die resistenten Mikroorganismen entsprechen 0,3% der Gesamtbesiedlung. Der Eintrag dieser resistenten Bakterien in den Boden ist der Güllebeaufschlagung zuzuschreiben. Das vielfach geringere Auftreten CTC-resistenter Mikroorganismen im Boden ist wohl dadurch zu erklären, dass die Bodenmikroorganismen die güllebürtigen Mikroorganismen verdrängen [Sengelov et al. 2003]. Den einzelnen Ergebnissen im Anhang ist zu entnehmen, dass die resistenten Bakterien nicht in allen Bodentiefen zu finden sind. Da die viele Mikroorganismen an Bodenpartikeln gebunden sind, werden diese nicht in tiefere Bodenschichten eingetragen.

In den 4 Sickerwasserproben sind nur in der Probe SR2 CTC-resistente Mikroorganismen auf dem Nähragar gewachsen. In der ersten Starkregenprobe SR 1 sind wahrscheinlich nur Bodenmikroorganismen ausgetragen worden, die, wie zuvor erwähnt, nicht CTC-resistent sind. In den Sickerwasserproben SR3 und SR4 sind auch keine resistenten Mikroorganismen nachweisbar. Die Veränderung der Redoxbedingungen im Boden könnte der Grund hierfür sein.

Die Esterase-Aktivität ist ein Maß für die extrazellulären Aktivitäten aller Mikroorganismen in der Probe. Die extrem hohe Esterase-Aktivität in der Gülle zeigt eine hohe Aktivität der Mikroorganismen an. Im Boden ist die Aktivität vor dem Versuch eher gering, steigt aber durch die Gülleeinbringung an, obwohl die Gesamtzahl der Bodenmikroorganismen abnimmt. Die mit der Gülle eingebrachten Nährstoffe erhöhen somit die enzymatische Aktivität der Bodenmikroorganismen. Im Vergleich mit den KBE-Zahlen von Gülle und Boden zeigt sich dass die Mikroorganismen in der Gülle eine höhere Esterase-Aktivität aufweisen, als die im Boden. Dieser Unterschied bleibt auch nach der Güllebeaufschlagung deutlich bestehen. Die Beschaffenheit der Bodenfauna ist also durch die Gülle nur wenig beeinflusst worden. Allerdings erhöhen die Mikroorganismen im Boden durch den Nährstoffeintrag aus der Gülle die Abbauaktivitäten. Eine Beeinflussung der Mikroorganismen durch eingetragene Antibiotika ließ sich mittels Esterase-Aktivität nicht anzeigen. Da aber kein Säulenversuch ohne Zugabe von Antibiotika zum Vergleich mit diesem Säulenversuch durchgeführt worden ist, kann dies nicht abschließend geklärt werden.

Den Ergebnissen der MHK-Bestimmung zufolge enthält die analysierte Gülle CTC-resistente Mikroorganismen. Dies entspricht den Ergebnissen der Veröffentlichungen von Feuerpfeil et al 1999, Aarestrup 2002, Burghard 2006, die ebenfalls resistente Bakterien in Gülleproben nachgewiesen haben. Durch die Medikation können sich im Körper des Tieres Resistenzen bei Mikroorganismen ausbilden. Die Resistenzen können zum Beispiel auf Plasmiden oder Transposons kodiert sein und durch Austausch von Plasmiden oder anderen genomischen Strukturen zwischen verschiedenen Mikroorganismen weiterverbreitet werden.

Durch Kultivierung einzelner Bakterienklassen, der in der Gülle enthaltenen Mikroorganismen konnte mit der MHK-Bestimmung und der PCR gezeigt werden, dass sowohl die isolierten Enterokokken, als auch die isolierten Coliformen und *E.coli* aus der Gülle CTC-resistent sind. Da diese beiden Bakterienklassen auch im Darm von Schweinen vorkommen, ist dies kein Beweis für die Weitergabe der Resistenzen über horizontalen Gentransfer. Aber man kann schon sagen, dass in beiden Bakterienklassen Resistenzgene über eine lange Zeitperiode nachweisbar sind. Die Studien von Feuerpfeil et al. 1999 belegten, dass antibiotikaresistente coliforme Bakterien in Gülleproben häufig vorkommen. Lunke 2004 bestätigte einen hohen Anteil an tetracyclin-resistenten Enterokokken in Gülleproben. Auch Aarestrup et al. 2002 postulierte tetracyclin-resistente Enterokokken in Schweinegülle.

In der Gülleprobe ist das Tetracyclin-Resistenzgen Tet M mit der PCR nachgewiesen worden. Es handelt sich bei Tet M um ein weit verbreitetes Resistenzgen das in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte [Aminov et al. 2000]. In einer Veröffentlichung von Burghard 2006 wird vermutet, dass dieses Resistenzgen im Boden nach kurzer Zeit verloren geht. Als mögliche Erklärung wird angenommen dass nicht etwa die Resistenz verloren geht, sondern dass die Mikroorganismen aus der Gülle durch die Bodenmikroorganismen verdrängt werden. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass in den analysierten Bodenproben kein Tet M nachgewiesen werden konnte. Die Persistenz des Tet M in Gülle ist als hoch anzusehen, da das Gen noch nach über 6 Monaten Lagerung nachgewiesen werden konnte.

## **5.2.2 Diskussion der Resistenzuntersuchungen zum Freilandversuch**

Die resistenten Bakterien, die mit der MHK-Bestimmung und der PCR in Gülleproben nachgewiesen wurden, sind über einen langen Zeitraum persistent in Gülle.

Das in zwei der drei Gülleproben keine resistenten Mikroorganismen mit der MHK-Bestimmung nachgewiesen werden konnten, kann daran liegen das die resistenten Mikroorganismen nicht kultivierbar sind. Tetracyclin-Resistenzgene sind in der PCR nachgewiesen worden.

Die Bodenproben aus Paderborn enthalten nach dem Ausbringen der Gülle resistente Mikroorganismen, die vor der Gülleausbringung (Boden 1 0-Probe) nicht nachgewiesen werden konnten. Die resistenten Mikroorganismen wurden also mit der Gülle in den Boden eingetragen. In einer Bodenprobe sind 4 Monate nach der 2. Gülleausbringung noch immer CTC-resistente Mikroorganismen nachzuweisen. Das bedeutet, das die Resistenzen auch im Boden über mindestens 4 Monate persistieren. Ein Anstieg von resistenten Bakterien bei den Bodenmikroorganismen nach Gülleausbringung zeigen auch Sengelov et al. 2003 und Burghard 2006. In beiden Veröffentlichungen wird aber auch eine schnelle Abnahme der Zahl der Resistenzgene im Boden nach Gülleausbringung postuliert. Bei Sengelov et al. 2003 wird ein Anstieg der Resistenzgene Tet A, Tet B und Tet C im Boden nach Güllebeaufschlagung beobachtet, der nach 5 Monaten wieder auf das Niveau vor der Güllebeaufschlagung zurückgeht. In der Veröffentlichung von Burghard 2006, bei der bereits nach 50 Tagen keine Resistenzgene (Tet M) mehr mit Real-Time PCR nachgewiesen werden können, wird das Absterben von güllebürtigen Mikroorganismen durch Konkurrenz mit Bodenmikroorganismen vermutet. Diese Ergebnisse können hier nicht bestätigt werden. In diesen beiden Untersuchungen werden einzelne Resistenzgene mit Real-Time PCR in den Proben nachgewiesen.

In der Gülleprobe aus dem Freilandversuch wurde ebenso wie in der Gülle aus dem Säulenversuch das Tetracyclin-Resistenzgen Tet M nachgewiesen. Die Schweine von denen die Gülle gewonnen wurde, haben eine Medikation mit CTC bekommen. Dadurch haben sich im Darm der Tiere resistente Keime gebildet, die mit den Ausscheidungen in die Gülle gelangt sind.

### **5.2.3 Diskussion der Resistenzuntersuchungen zum Batchversuch**

Die auf Schrägagar vorliegenden Proben, die im Batchversuch als resistente Mikroorganismen ermittelt worden sind, wurden in der MHK-Bestimmung auf vorhandene resistente Mikroorganismen untersucht. SFD-resistente Mikroorganismen können nicht bestimmt werden, da die Methode für SFD nicht einsetzbar ist. Bei der Bestimmung von CTC-resistenten Mikroorganismen wurden in zwei Proben, die Mikroorganismen aus Bodenproben enthalten, resistente Mikroorganismen nachgewiesen. Die Resistenz wurde durch Zugabe von CTC zur Probe und Inkubation von einigen Wochen induziert. Die anderen Proben waren zwar noch

kultivierbar, zeigten aber keine resistenten Mikroorganismen. Die Resistenz kann durch fehlenden Selektionsdruck verloren gegangen sein. In der PCR ist in keiner der Proben eines der analysierten Tetracyclin-Resistenzgene Tet H, Tet L, Tet M, Tet O, Tet Q und Tet W nachgewiesen worden. Da es noch 30 andere Tetracyclin-Resistenzgene gibt, besteht die Möglichkeit, dass eines der anderen Resistenzgene vorhanden ist, das für eine Resistenz kodiert.

#### **5.2.4 Diskussion der Resistenzuntersuchungen von Umweltproben**

In einer Oberflächenwasserprobe sind resistente Mikroorganismen nachgewiesen worden. Auch in anderen Studien sind Resistenzen in Oberflächengewässern nachgewiesen worden. In diesen Studien wird vermutet, dass die Resistenzen durch Abschwemmung güllebürtiger Mikroorganismen vom Boden in das Wasser gelangt sind. Auch in diesem Fall ist dies als Grund für die resistenten Mikroorganismen zu vermuten, da der Bach mitten durch ein stark landwirtschaftlich genutztes Gebiet fließt und daher ein Eintrag von Gülle möglich ist.

Da in den weiteren Oberflächenwasser- und Grundwasserproben keine resistenten Keime nachgewiesen wurden, ist zu vermuten, dass dieser Eintragsweg für resistente Bakterien in die Umwelt eher selten ist.

## 6 Fazit und Ausblick

Es wurden in einer Reihe von Umweltproben und Bakterienisolaten die KBE-Zahlen und Esterase-Aktivitäten bestimmt. Mit einer Modifikation der KBE-Zahlen, der MHK-Bestimmung und der PCR wurde das Vorkommen resistenter Bakterien untersucht. Die KBE-Zahl zeigt die Biomasse und die Esterase-Aktivität zeigt die Bioaktivität der in der Probe vorhandenen Bakterien.

Die Ergebnisse zeigten:

- zur Bestimmung von SFD-resistenten Bakterien ist der Vergleich der KBE-Zahlen von antibiotikahaltigen und antibiotikafreien Nährmedien nicht geeignet, da das SFD im Nähragar nicht antibiotisch wirksam ist
- auch die nach DIN-Norm durchgeführte Methode der MHK-Bestimmung ist aus diesem Grund zur Bestimmung SFD-resistenter Bakterien nicht geeignet
- der Vergleich der KBE-Zahlen von antibiotikahaltigen und antibiotikafreien Nährmedien und auch die MHK-Bestimmung kann zur Bestimmung von CTC-resistenten Bakterien eingesetzt werden
- durch vorangestellte Kultivierung auf selektiven Nährböden, kann mit diesen beiden Methoden auch die Bakterienklasse der resistenten Bakterien bestimmt werden
- eine Einschränkung der beiden Verfahren ist, dass nur kultivierbare Bakterien (in dieser Arbeit auf DEV-Nähragar kultivierbare) bestimmt werden können
- mit der PCR werden alle Bakterien, die in einer Probe enthalten sind analysiert
- aber die PCR-Methode ist zur Bestimmung der Summe der resistenten Bakterien nicht geeignet, da nur spezifische Resistenzgene erfasst werden und für Tetracyclin sind bisher 36 verschiedene bekannt
- die 3 Resistenzgene gegen Sulfonamide können auch mit der PCR bestimmt werden
- damit alle Bakterien aus Gülle- und Bodenproben bestimmt werden können, muss aber die PCR-Aufarbeitungsmethode optimiert werden, so dass die Huminstoffe eliminiert werden
- die Gülle- und Bodenproben konnten in dieser Arbeit nur durch vorangestellte Kultivierung auf DEV-Nähragar analysiert werden und dadurch ging der Vorteil gegenüber den anderen Methoden verloren
- bei Einsatz der Real-Time PCR ist mit dieser Methode auch eine Quantifizierung der Resistenzgene möglich

Die beiden Kultivierungsverfahren konnten für SFD nicht angewendet werden und in der PCR gab es kein positives Ergebnis. Mit den Methoden der modifizierten KBE-Zahlen, der MHK-Bestimmung und der PCR konnten CTC-resistente Bakterien nachgewiesen werden. Es wurden mit allen drei Methoden CTC-resistente Bakterien in Gülleproben nachgewiesen. Mit der MHK-Bestimmung konnten auch in Boden- und sogar in einer Oberflächenwasserprobe CTC-resistente Bakterien nachgewiesen werden. Die CTC-resistenten Bakterien wurden durch Gülleausbringung in den Boden eingetragen und sind wahrscheinlich durch Oberflächenabfluss in das Oberflächenwasser gelangt.

Da die MHK-Bestimmung eine sehr zeitintensive Analyse ist und durch die zuvor nötige Kultivierung noch umfangreicher wird ist die modifizierte KBE-Zahl-Bestimmung dem vorzuziehen, da sie auch eine semiquantitative Bestimmung darstellt. Die MHK-Bestimmung könnte man dadurch praktikabler machen, dass man die Proben auf die Nährmedien bringt. Dadurch könnte aber der Unterschied in den Bakterienzahlen von verschiedenen Proben zu Fehlern führen. Vergleichende MKH-Bestimmungen von Proben und Bakterienisolaten dieser Proben könnten zur Quantifizierung dieser Unterschiede gemacht werden.

Die Probenaufarbeitung der PCR für Gülle und vor allem für Bodenproben muss optimiert werden. Dann könnte man durch Einsatz der Real-Time PCR auch eine Quantifizierung der Resistenzgene etablieren.

Neben der Weiterentwicklung von Bestimmungsmethoden für Resistenzgene besteht weiterhin Forschungsbedarf zur Aufklärung von Resistenzen. Besonders Daten über die Weiterverbreitung der Resistenzen in der Umwelt müssen weiter gesammelt werden. Die Mechanismen der Weitergabe der Resistenzen müssen besser verstanden und analysiert werden, um dann der Gefahr der zunehmenden Resistenzen entgegenzuwirken.

## 7 Literaturverzeichnis

**Aarestrup**, F.M., H. Hasman, L.B. Jensen, M. Moreno, I.A. Herrero, L. Dominguez, M. Finn, A. Franklin (2002): Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries; Applied and environmental microbiology Vol. 68, S. 4127-4129

**Agerso**, Y., Jensen, L.B., Givskov, M., Roberts, M.C. (2002): The identification of a tetracycline resistance gene tet(M), on a Tn916-like transposon, in the Bacillus cereus group; FEMS Microbiology letters, Vol. 214, S. 251-256

**Agerso**, Y., Sandvang, D. (2005): Class 1 Intergrons and tetracycline resistance genes in Alcaligenes, Arthrobacter, and Pseudomonas spp. Isolated from pigsties and manured soil; Applied and environmental microbiology Vol. 71, S. 7941-7947

**Aminov**, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I. (2000): Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, S. 22-32

**Aminov**, R.I., J.C. Chee-Sandford, N. Garrigues-Jeanjean, B. Teferedegne, I.J. Krapac, B.A. White, R.I. Mackie, (2002): Development, validation and application of PCR-primers for detection of tetracycline efflux genes of gram negative bacteria; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, S. 1786-1793

**Bast**, Dr. E. (1999): Mikrobiologische Methoden – Eine einföhrung in Grundlegende Arbeitstechniken; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, S. 297-299

**Berger**, K., Petersen, B., Büning-Pfaue, H., 1986, Persistenz von Gülle-Arzneistoffen in der Nahrungskette; Archiv für Lebensmittelhygiene, Vol. 37, S. 85-108

**Boerlin**, P., R. Travis, C.L. Gyles, R. Reid-Smith, N. Janecko, H. Lim, V. Nicholson, S.A. McEwen, R. Friendship, M. Archambault (2005): Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario; Applied and Environmental Microbiology Vol. 71, S. 6753-6761

**Büchner**, N. (2006): Partikelmedierte Verlagerung von güllebürtigem Chlor-Tetracyclin und Sulfadiazin in einer Ackerbodensäule; Diplomarbeit, Institut für Geologie der technischen Universität Bergakademie Freiberg

**Burghard**, C., Bauer, Prof. Dr. J. (2006): Antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene in Gülle; Schriftenreihe der LfL Bayern, 5. Kulturlandschaftstag, 1. Auflage April 2006

**Chopra**, I., M. **Roberts** (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance; Microbiology and molecular biology reviews, Vol. 65, S. 232-260

**Christian**, T. (2004): Antibiotika in Oberflächengewässern Nordrhein-Westfalens, Herkunft, Eintrag, Verbleib und Relevanz; Dissertation, (Hrsg.) Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**DIN 38414-4**, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Schlamm und Sedimente, Bestimmung der Eluierbarkeit mit Wasser; Ausgabe 1984-10

**DIN 58940-4 Bbl 1**, Medizinische Mikrobiologie – Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – Teil 4: Bewertungsstufen der minimalen Hemmkonzentration; MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen; Ausgabe 2004-02

**DIN 58940-6 Bbl 1**, Medizinische Mikrobiologie – Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – MHK der Testsubstanzen bei Kontrollstämmen für die Agar-Dilutionsmethode; Ausgabe 1989-06

**DIN 58940-6**, Medizinische Mikrobiologie – Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika – Teil 6: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach der Agar-Dilutionsmethode; Ausgabe 2003-04

**Dreifert, M.** (1999): Antibiotika – Eine Waffe wird stumpf, www-Dokument vom 7.7.2006 (Adresse: [www.quarks.de/antibiotika/06.htm](http://www.quarks.de/antibiotika/06.htm))

**Dürckheimer, W.** (1975): Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen; Angewandte Chemie, 87. Jahrgang 1975, Heft 21, S. 751-784

**Engels, H.** (2004): Verhalten von ausgewählten Tetracyclinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und Böden; Dissertation, (Hrsg.) Forschungs- und Studienzentrum für Veredlungswirtschaft Weser-Ems der Georg-August-Universität Göttingen und Fakultät für Agrarwissenschaften Göttingen

**Falbe, J., Regitz, M.** (Hrsg.) (1992): Römpp Chemie Lexikon; Georg Thieme Verlag, Stuttgart

**Fallert-Müller, Dr. Angelika:** Lexikon der Biochemie; 1. Auflage 1999/2000, Spektrum Verlag, Elsevier GmbH, München

**FEDESA** "Antibiotic use of animals does not threaten human health."  
Pressemitteilung, Initiatives of the European Federation of Animal Health - FEDESA, Konferenz, Visby, Schweden, 13.06.2001

**Feuerpfeil, I., Lopez-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E., Szewzyk, R.** (1999): Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt; Bundesgesundheitsblatt Vol. 42, S. 32-50

**Frank, V.** (2006): Rückstände in der Umwelt, Wiener Zeitung, www-Dokument vom 7.7.2006 (Adresse: [www.wienerzeitung.at/antibiotika](http://www.wienerzeitung.at/antibiotika))

**Gräfe, U.** (1992): Biochemie der Antibiotika: Struktur – Biosynthese – Wirkmechanismus; Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag

**Grote, M., Freitag, M., Betsche, T.** (2004): Versuche und Untersuchungen zur umweltverträglichen und standortgerechten Landwirtschaft - Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente; Abschlussbericht, (Hrsg.) Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz NRW

- Grote, M., Schwake-Anduschus, C., Stevens, H., Michel, R., Freitag, M., Betsche, T. (2006):** Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden- Ergebnisse eines Modellversuchs; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Birkhäuser Verlag, Basel, Vol. 1 (2006), S. 38-50
- Halling-Sørensen, B., G. Sengeløv, J. Tjørnelund (2002):** Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria; Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 42, S. 263–271
- Halling-Sorensen, B.; S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lutzhoft, S.E. Jorgensen, (1998):** Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - A Review; Chemosphere, Vol. 36, S. 357-393
- Hamscher, G. (2003):** Entwicklung und Einsatz neuer rückstandsanalytischer Nachweisverfahren für Antibiotika und Antiparasitika in Umwelt- und Lebensmittelproben; Habilitation, (H.rsg.) Zentrumsabteilung der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare, A., Höper, H., Nau, H. (2000):** Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden; Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, Vol. 107, S. 293-348
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. (2002):** Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry; Analytical Chemistry, Vol. 74, S. 1509-1518
- Helmuth, R. (1999):** Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Veterinärmedizin; Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz, Springer-Verlag, Vol. 42, S. 26-34
- Höper, H., Hamscher, G., Pawelzick, H., Schäfer, W., Nau, H. (2003):** Occurrence and fate of tetracyclines and sulfonamides in soils fertilized with animal manure; aus: Diffuser Eintrag von Chemikalien in Boden und Grundwasser, Mitteilungen des Instituts für Grundwasserwirtschaft der TU Dresden, S. 117-124
- Höper, H., Kues, J., Nau, H., Hamscher G. (2002):** Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden; Bodenschutz Vol. 7, S. 141-148.
- Huovinen, P., L. Sundstrom, G. Swedberg, O. Sköld (1995):** Trimethoprim and Sulfonamide Resistance; Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. 44, S. 279–289
- Kilb, B., Kuhlmann, B., Eschweiler, B., Preuß, G., Ziemann, E., Schöttler, U. (1998):** Darstellung der mikrobiellen Besiedlungsstruktur verschiedener Grundwasserhabitats durch Anwendung molekularbiologischer Methoden; Acta Hydrochim. Hydrobiol. Vol. 26, S. 349 – 354
- Kreuzig, R., Höltge, S. (2005):** Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: Laboratory experiments and test plot studies; Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24 (4), S. 771-776

**Kreuzig, R., Kullmer, C., Matthies, B., Höltge, S., Dieckmann, H. (2003):** Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils; Fresenius Environmental Bulletin, Vol. 12, S. 550-558.

**Kümmerer, K., 2001:** Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks; 1. Auflage, Berlin, Springer Verlag

**Kümmerer, K., 2003:** Significance of antibiotics in the environment; Journal of Antimicrobial Chemotherapy; Vol. 52, S. 5-7

**Kümmerer, K., Alexy, R., Hüttig, J., Schöll, A. (2004):** Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics an environmental bacteria; Water Resarch, Vol. 38, S. 2111-2116

**Kutzera, J. (2005):** Effekte von Chlortetracyclin und Sulfadiazin auf die mikrobielle Besiedlung von Grundwasser, Oberflächenwasser und Boden; Bachelorarbeit, Fachbereich Chemie der Universität Duisburg

**Langhammer, J.P. (1989):** Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld; Dissertation, Universität Bonn

**Lunke, C. (2004):** Antibiotikaresistenzen bei Bakterien tierischer Herkunft; Dissertation, Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

**Michel, R. (2005):** Bestimmung von Arzneistoffrückständen aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung in Boden und Pflanzen mit LC-MS-MS; Diplomarbeit, Universität Paderborn

**MUNLV NRW, A. Vockel (2004):** Abschlussbericht zum Projekt: Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung; Zeitraum: 2000-2002

**Naidong, W., E. Roets, R. Busson, J. Hoogmartens (1990):** Separation of keto-enol tautomers of chlortetracycline and 4-epichlortetracycline by liquid chromatography on poly(styrene-divinybenzene)copolymer; Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Vol. 8, S. 881-889

**Neumeister, B., Winklhofer, K. (1997):** Medizinische Mikrobiologie; 1. Auflage, Mediscipt-Verlag

**Obst, U., Holzappel-Pschorn, A. (1988):** Enzymatische Tests für die Wasseranalytik; Oldenbourg Verlag, München Wien, S. 42-44

**Roberts, M. (2006):** Tetracyclin-Resistenz-Datenbank ; www-Dokument vom 11.7.2006 (Adresse: [faculty.washington.edu/marilynr/](http://faculty.washington.edu/marilynr/))

**Sacher, F., Gabriel, S., Metzinger, M., Stretz, A., Wenz, M., Lange, F.T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I. (2002):** Arzneimittelwirkstoffe im Grundwasser - Ergebnisse eines Monitoring-Programms in Baden-Württemberg; Vom Wasser, Vol. 99, S. 183-196

**Sattelberger, S. (1999):** Arzneimittelrückstände in der Umwelt, Bestandsaufnahme und Problemstellung; Report des Umweltbundesamtes Österreich, (Hrsg.) Eigenverlag, Wien

**Sattelberger, S., Gans, O., Martinez, E. (2005),** Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden, UBA-Bericht BE-272, (Hrsg.) Umweltbundesamt GmbH, Eigenverlag, Wien, S. 3-103

- Schwartz, T., W. Kohnen, B. Jansen, U. Obst (2002):** Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms; *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 43, S. 325-335
- Sengelov, G., Agerso, Y., Halling-Sorensen, B., Baloda, S.B., Andresen, J.S., Jensen, L.B. (2003):** Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry; *Environmental International*, Vol. 28, S. 587-595
- Stettler, S. (2004):** Extrahierbarkeit und Transportverfügbarkeit von Sulfonamiden in Grünlandböden nach Gülle-Applikation; Diplomarbeit, (Hrsg.) Eidgenössische Technische Hochschule Dübendorf
- Thiele-Bruhn, S. (2003a):** Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review; *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Vol. 166, S. 145-167
- Thiele-Bruhn, S., Blume, H.P., Fischer, W.R., Frede, H.G., Horn, R. (2003b):** Antibiotika, In: *Handbuch der Bodenkunde*; 15. Ergänzungslieferung, (Hrsg.) Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, S. 1-20
- Warman, P.R., Thomas, R.L. (1981):** Chlortetracycline in soil amended with poultry manure; *Canadian Journal of Soil Science*, Vol. 61, S. 161-163.
- Winckler, C., Grafe, A. (2000):** Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden; Abschlussbericht für die Landwirtschaftskammer Weser-Ems, Forschungsbericht 297 33911, UBA-Text 44/00, (Hrsg.) Umweltbundesamt, Eigenverlag, Berlin, S. 1-145
- Winckler, C.; Engels, H.; Hund-Rinke, K.; Luckow, T.; Simon, M.; Steffens, G. (2004):** Verhalten von Tetracyclinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden; im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin, UBA-Text 44/04, (Hrsg.) Umweltbundesamt, Eigenverlag, Berlin
- Yu, Z., F.C. Michel, G. Hansen, T. Wittum, M. Morrison (2005):** Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 11, S. 6929-6933
- Zurhelle, G. (2000):** Entwicklung und Anwendung einer HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse – Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen; Dissertation, (Hrsg.) Fachbereich 9 Lebensmittelchemie der Bergischen Universität – Gesamthochschule Wuppertal

## 8 Anhang

### A Informationen zu den Tetracyclin-Resistenzgenen 1

TetR-Gen	Resistenz-Mechanismus	Bakteriengruppen (in denen das Gen nachgewiesen wurde)
Tet A	Efflux-Pumpen	Pseudomonas, E.coli, Acinetobacter Salmonella, Vibrio, Shigella
Tet B	Efflux-Pumpen	Shigella, E.coli, Acinetobacter Enterobacter, Salmonella, Vibrio, Pasteurella
Tet C	Efflux-Pumpen	Salmonella, E.coli, Aeromonas Enterobacter, Pseudomonas, Vibrio, Shigella
Tet D	Efflux-Pumpen	Pasteurella, Salmonella, Alteromonas Enterobacter, Vibrio, E.coli, Shigella
Tet E	Efflux-Pumpen	E. coli, Pseudomonas, Vibrio
Tet F	nicht bekannt	nicht nachgewiesen
Tet G	Efflux-Pumpen	Salmonella (DT104), Vibrio, Pseudomonas Pasteurella,
Tet H	Efflux-Pumpen	Pasteurella, Acinetobacter, Actinobacillus Mannheimia
Tet I	Efflux-Pumpen	E.coli
Tet J	Efflux-Pumpen	Proteus
Tet K	Efflux-Pumpen	Lactobacillus, Streptomyces, Eubacterium Haemophilus, Clostridium,
Tet L	Efflux-Pumpen	Actinobacillus, Salmonella, Veillonella Enterococcus, Steptococcus, Staphylococcus
Tet M	Veränderung der Ribosomen (RPP)	Enterococcus, Enterobacter, Acinetobacter, Vibrio, Pseudomonas, E. coli, Lactobacillus, Steptocuccus, Pasteurella
Tet N	nicht bekannt	nicht nachgewiesen

Tet O	Veränderung der Ribosomen (RPP)	Megasphaera, Neisseria, Strptococcus Campylobacter, Enterococcus
Tet P	nicht bekannt	nicht nachgewiesen
Tet Q	Veränderung der Ribosomen (RPP)	Campylobacter, Bacteriodes
Tet R	nicht bekannt	nicht nachgewiesen
Tet S	Veränderung der Ribosomen (RPP)	Lactococcus, Lactobacillus, Veillonella, Enterococcus
Tet T	Veränderung der Ribosomen (RPP)	nicht nachgewiesen
Tet U	nicht bekannt	Staphylococcus
Tet V	Efflux-Pumpen	nicht nachgewiesen
Tet W	Veränderung der Ribosomen (RPP)	Streptococcus, Staphylococcus, Lactobacillus, Clostridium, Actinomyces, Veillonella
Tet X	enzymatisch	Bactriodes
Tet Y	Efflux-Pumpen	E. coli
Tet Z	Efflux-Pumpen	Corynebacterium
Tet 30	Efflux-Pumpen	Agrobacterium
Tet 31	Efflux-Pumpen	nicht nachgewiesen
Tet 32	Veränderung der Ribosomen (RPP)	Clostridium
Tet 33	Efflux-Pumpen	Corynebacterium
Tet 34	enzymatisch	Vibrio
Tet 35	Efflux-Pumpen	Vibrio, Stenotrophomonas
Tet 36	Veränderung der Ribosomen (RPP)	Clostridium, Lactobacillus

Tet 37	enzymatisch	Streptomyces
Tet 38	Efflux-Pumpen	Staphylococcus
Tet 39	Efflux-Pumpen	Acinetobacter

Quellen: Aminov et al. 2000, Aminov et al. 2002, Aarestrup et al. 2002, Yu et al. 2005, Agerso et al. 2005, Chopra, Roberts 2001, Roberts 2006

## B Informationen zu den Tetracyclin-Resistenzgenen 2

TetR-Gen	Sequenz des Primer-paars (5'-3')	annealing Temp.(°C)	Amplicon-Größe (bp)
Tet A	FW: GCGCGATCTGGTTCACCTCG RV: AGTCGACAGYRGC GCCGGC	61	164
Tet B	FW: TACGTGAATTTATTGCTTCGG RV: ATACAGCATCCAAAGCGCAC	61	206
Tet C	FW: GCGGGATATCGTCCATTCCG RV: GCGTAGAGGATCCACAGGACG	68	207
Tet D	FW: GGAATATCTCCCGAAGCGG RV: CACATTGGACAGTGCCAGCAG	68	187
Tet E	FW: GTTATTACGGGAGTTTGTGG RV: AATACAACACCCACACTACGC	61	199
Tet F	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet G	FW:GCAGAGCAGGTCGCTGG RV: CCYGCAAGAGAAGCCAGAAG	68	134
Tet H	FW: CAGTGAAAATTCACCTGGCAAC RV: ATCCAAAGTGTGGTTGAGAAT	61	185
Tet I	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet J	FW: CGAAAACAGACTCGCCAATC RV: TCCATAATGAGGTGGGGC	61	184
Tet K	FW: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC RV: GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	nicht bestimmt	718

Tet L	FW: CATTGGTCTTATTGGATCG RV: ATTACACTTCCGATTTCCGG	50	488
Tet M	FW: ACAGAAAGCTTATTATATAAC RV: TGGCGTGTCTATGATGTTCCAC	55	171
Tet N	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet O	FW: ACGGARAGTTTATTGTATAACC RV: TGGCGTATCTATAATGTTGAC	60	171
Tet P	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet Q	FW: AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG RV: CGGAGTGTCAATGATATTGCA	63	169
Tet R	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet S	FW: GAAAGCTTACTATACAGTAGC RV: AGGAGTATCTACAATATTTAC	50	169
Tet T	FW: AAGGTTTATTATATAAAAGTG RV: AGGTGTATCTATGATATTTAC	46	169
Tet U	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet V	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet W	FW: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC RV: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	64	168
Tet X	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet Y	FW: ATTTGTACCGGCAGAGCAAAC RV: GGCGCTGCCGCCATTATGC	68	181
Tet Z	FW: CCTTCTCGACCAGGTCGG RV: ACCCACAGCGTGTCCGTC	61	204
Tet 30	FW: CATCTTGGTCGAGGTGACTGG RV: ACGAGCACCCAGCCGAGC	68	210
Tet 31	FW: GCTCTATCTAGGGAGAATGA RV: GCTAACCATGATACCTTGTA	nicht bestimmt	652
Tet 32	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet 33	FW: ATGCGGTTCCGCTGAA RV: GGAAAATGCGTCAGTGACAA	nicht bestimmt	784

Tet 34	FW: ATACGGGGATGCAAACCTTCA RV: ACGAGTGAGCTCTGATGTCTCTT	nicht bestimmt	729
Tet 35	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet 36	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet 37	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet 38	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tet 39	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt

Quellen: Aminov et al. 2000, Aminov et al. 2002, Aarestrup et al. 2002, Yu et al. 2005, Agerso et al. 2005, Chopra, Roberts 2001, Roberts 2006

### C Informationen zu den Sulfonamid-Resistenzgenen

SulR-Gen	Bakteriengruppen	Sequenz der Primer-paare (5'-3')	annealing Temp. (°C)	Amplicon Größe (bp)
Sul 1	E. coli, Enterobacter, Klebsiella, Proteus	FW: GTGACGGTGTTCGGCATTCT RV: TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	68	779
Sul 2	E. coli, Enterobacter Klebsiella	FW: CGGCATCGTCAACATAACCT RV: TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	66	721
Sul 3	E. coli	FW: GAGCAAGATTTTTGGAATCG RV: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	51	880

Quelle: Boerlin et al 2005

## D Temperaturprogramme der PCR

### R2 52re [Yu 2005] Ribo-2 FW/RV

#### touchdown PCR

Denaturierung	94°C	4 min
5 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	56°C	90 sec
Extension	72°C	60 sec
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	52°C	90 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

je Zyklus 1°C weniger

### Standard Tet M [Aminov 2000] Tet M FW/RV

#### normale PCR

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

### Standard Tet O Tet O FW/RV

#### normale PCR

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	60°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

**Standard Tet Q  
Tet Q FW/RV****normale PCR**

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	63°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

**Standard Tet W  
Tet W FW/RV****normale PCR**

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	64°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

**Standard Tet H  
Tet H FW/RV****normale PCR**

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	61°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

**Standard Tet L  
Tet L FW/RV****normale PCR**

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	50°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

**Standard Sul 1  
Sul 1 FW/RV**

**normale PCR**

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	68°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

**Standard Sul 2  
Sul 2 FW/RV**

**normale PCR**

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	66°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

**Standard Sul 3  
Sul 3 FW/RV**

**normale PCR**

Denaturierung	94°C	4 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 sec
annealing	51°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Extension	72°C	7 min

## E Alle Ergebnisse KBE-Zahlen

<b>Boden, KBE/ml:</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	4.470.666,7	4.007.666,7	0,0	3.861.666,7
R2A-Agar	3.410.000,0	1.400.000,0	0,0	2.930.000,0
Endo-Agar	0,0	0,0	0,0	0,0

<b>Gülle, KBE/ml:</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	41.810.000,0	39.490.000,0	4.730.000,0	46.295.000,0
R2A-Agar	41.200.000,0	29.030.000,0	125.000,0	31.150.000,0
Endo-Agar	1.750,0	2.350,0	800,0	1.500,0

### Starkregenergeignisse, KBE / ml:

<b>SR1 (23.12.05)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	79.120,0	43.240,0	0,0	44.160,0
R2A-Agar	66.240,0	46.920,0	5.290,0	64.490,0
Endo-Agar	56,0	26,5	1,5	13,0

<b>SR2 (25.01.06)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	5.060,0	4.140,0	190,0	6.440,0
R2A-Agar	75.900,0	n.b.	200,0	15.800,0
Endo-Agar	286,5	0,0	101,5	194,5

<b>SR3 (15.02.06)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	7.590,0	7.360,0	0,0	850,0
R2A-Agar	184.000,0	98.900,0	10.700,0	239.200,0
Endo-Agar	2,0	2,0	0,0	2,0

<b>SR4 (01.03.06)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	3.910,0	5.750,0	0,0	7.820,0
R2A-Agar	248.400,0	138.000,0	240,0	149.500,0
Endo-Agar	1,0	1,0	0,0	1,0

<b>Boden 1 (T 0-5cm)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	2.300.000,0	820.000,0	10.000,0	1.920.000,0
R2A-Agar	2.880.000,0	810.000,0	10.000,0	3.410.000,0
Endo-Agar	10,0	0,0	0,0	2.060,0

<b>Boden 2 (T 5-10cm)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	700.000,0	510.000,0	0,0	870.000,0
R2A-Agar	890.000,0	470.000,0	0,0	1.010.000,0
Endo-Agar	0,0	0,0	0,0	1.820,0

<b>Boden 3 (T 10-20cm)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	1.820.000,0	1.630.000,0	20.000,0	1.540.000,0
R2A-Agar	4.600.000,0	900.000,0	0,0	3.400.000,0
Endo-Agar	0,0	0,0	0,0	2.590,0

<b>Boden 4 (T 20-30cm)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	1.920.000,0	670.000,0	0,0	910.000,0
R2A-Agar	1.820.000,0	1.010.000,0	10.000,0	2.200.000,0
Endo-Agar	1,0	0,0	20,0	2.170,0

<b>Boden 5 (T 40-50cm)</b>	ohne	SFD	CTC	isoCTC
DEV-Agar	240.000,0	980.000,0	0,0	120.000,0
R2A-Agar	80.000,0	150.000,0	0,0	80.000,0
Endo-Agar	0,0	0,0	0,0	0,0

## F Prozentuale Anteile resistenter Bakterien (KBE-Zahl)

<b>Probe</b>	<b>DEV-CTC</b>
<b>Boden (Beginn)</b>	0,0%
<b>Gülle (Beginn)</b>	11,3%
<b>SR1 (Jan.05)</b>	0,0%
<b>SR2 (Jan.05)</b>	3,8%
<b>SR3 (Feb.05)</b>	0,0%
<b>SR4 (Feb.05)</b>	0,0%
<b>Boden (Ende)</b>	0,3%
	<b>R2A-CTC</b>
<b>Boden (Beginn)</b>	0,0%
<b>Gülle (Beginn)</b>	0,3%
<b>SR1 (Jan.05)</b>	8,0%
<b>SR2 (Jan.05)</b>	0,3%
<b>SR3 (Feb.05)</b>	5,8%
<b>SR4 (Feb.05)</b>	0,1%
<b>Boden (Ende)</b>	0,1%

## G Ergebnisse der Esterase-Aktivität

Ereignis	Probe	Esterase-Aktivität in ng/ml/h
Anfang	Gülle (Düse)	29239,47
	Boden	35,40
SR1	Sickerwasser	2,19
SR2	Sickerwasser	4,21
SR3	Sickerwasser	2,99
SR4	Sickerwasser	4,63
Ende	Boden T 0-5cm	140,55
	Boden T 5-10cm	190,49
	Boden T 10-20cm	108,67
	Boden T 20-30cm	126,04
	Boden T40-50cm	117,33





**Institut für Wasserforschung GmbH**  
**Zum Kellerbach 46**  
**D-58239 Schwerte**

**Telefon: (+49/0) 2304-9575-300**

**Fax: (+49/0) 2304-9575-220**

**E-Mail: [ifw@ifw-dortmund.de](mailto:ifw@ifw-dortmund.de)**

**Internet: [www.ifw-dortmund.de](http://www.ifw-dortmund.de)**